

# *In vitro* studier av heroinmetabolisme i human lever

Ingvild Juul-Hansen



Masteroppgave i toksikologi

Institutt for Biovitenskap

Det Matematisk-Naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Juni 2015



# ***In vitro* studier av heroinmetabolisme i human lever**

© Ingvild Juul-Hansen

2015

*In vitro* studier av heroinmetabolisme i human lever

Ingvild Juul-Hansen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo



# Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Folkehelseinstituttet, divisjon for rettsmedisinske fag, avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling fra august 2013 til juni 2015 i samarbeid med Universitet i Oslo, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Institutt for Biovitenskap. Veiledere har vært forsker Inger Lise Bogen (Folkehelseinstituttet) og professor Ketil Hylland (Universitet i Oslo).

Mange mennesker har bidratt til å forme denne oppgaven og på ulike måter bistå meg under prosessen. Først vil jeg takke Inger Lise Bogen for godt samarbeid, tett oppfølging og gode diskusjoner. Din veiledning har vært lærerik og profesjonell. Takk til Ketil Hylland for alltid å stille opp, selv med en arbeidsdag på 30 (?) timer. Takk til Linda Helen Olsen for din trygge og lærerike veiledning og undervisning innen analytikk. Takk til Fernando Boix for uvurderlig bidrag til statistikk og kinetikk. Takk til Jørg Mørland for faglig bidrag på høyt nivå. Takk til Jannike Mørch Andersen for svar på de merkeligste spørsmål, samt gode innspill. Takk til Elisabeth Nerem for din utrolige tålmodighet. Takk til Synne Steinsland for din effektive undervisning. Takk til Saranda Kabashi for ditt engasjement. Takk til Anne Marte Sjursen Kvellø for din generøsitet. Takk til Ida Bergseteren og Marthe Lid for høylytte saklige og usaklige diskusjoner og masse latter. Takk til analytikerne i 5. etg. for bistand på lab, spesielt Thomas Berg og Elisabeth Leere Øiestad. Takk til FHI for muligheten. Takk til Kamilla Tallerud for at din dør alltid er åpen. Takk til Ragna Byrkjeland for at du er den du er. Takk til mormor og bestefar for å alltid minne meg på hva som faktisk er viktig. Takk til mamma, pappa og Sverre for alt.



# Sammendrag

Heroin er et mye misbrukt opioid som er involvert i de fleste narkotikarelaterte dødsfallene i Norge. Utvikling av såkalt farmakokinetisk rettet terapi har i den senere tid fått økende interesse, men detaljert kunnskap om heroinmetabolisme i menneske er mangelfull. Tidligere studier av heroinmetabolisme har hovedsakelig blitt utført med forsøksdyr som rotter og mus. Det eksisterer artsforskjeller i esteraseaktivitet som kompliserer ekstrapolering til menneske, og gjør at det stilles spørsmål ved overføringsverdien til dyrestudier av heroinmetabolisme. Målet med denne studien var å studere heroinmetabolisme i humane leverpreparater, og identifisere hvilke esteraser som var medvirkende. Kommersiell humane levermikrosomer og homogenisert humant levervev fra pasienter ved Oslo Universitetssykehus ble brukt som studiemateriale i denne oppgaven. LC-MS/MS ble brukt for kvantifisering av heroin og heroin-metabolitter. *In vitro* studier av heroin- og 6-MAM-metabolisme med og uten tilsetning av esteraseinhibitorer ble utført i humant leverhomogenat og/eller levermikrosomer. Esteraseinhibitorer ble brukt for å identifisere esteraser involvert i heroinmetabolisme, og resultatene indikerte at karboksylesterase og acetylkolinesterase var viktige for hepatisk omdannelse av heroin hos menneske. Resultatene antyder også at viktige heroinmetaboliserende enzymer var lokalisert i levermikrosomfraksjonen. Kofaktoren UDPGA ble også tilsatt i leverhomogenat og levermikrosomer for å påvise glukuronidering av morfin til metabolittene morfin-3-glukuronid og morfin-6-glukuronid, uten å gi forventede resultater. Beregning av kinetiske parametere indikerte at nedbrytningen av heroin og 6-MAM skjer svært raskt i humant leverhomogenat og humane levermikrosomer. På tross av at human lever metaboliserer heroin mer effektivt sammenliknet med rottelever, har artene tilnærmet lik *in vivo* halveringstid for heroin. Våre studier antyder derfor at rotte er en god modellorganisme for *in vivo* studier av heroinmetabolisme. Våre studier indikerer også at humane levermikrosomer kan erstatte humant leverhomogenat som *in vitro*-modell for hepatisk biotransformasjon av heroin i videre studier.





# Forkortelser

6-MAM	6-monoacetylmorfin
AChE	Acetylkolinesterase
ACN	Acetonitril
BChE	Butyrylkolinesterase
Benzylisatin	1-benzyl-1H-indole-2,3-dione
BNPP	Bis(4-nitrofenyl)fosfat
BW284c51	1,5-Bis(4allyldimetylammoniumfenyl)pentan-3-one dibromid
CE	Karboksylesterase
C <sub>max</sub>	Konsentrasjonsmaksimum
CYP	Cytokrom P450
d	Deuterert
ER	Endoplasmatisk retikulum
ESI+	Elektrospray i positiv modus
Ethopropazin	10-(2 Dietylaminopropyl)fenothiazin,10-[2-(Dietylamino)propyl]fenothiazin
FHI	Folkehelseinstituttet
<i>g</i>	Gravitasjon
hCE1/2	Human karboksylesterase 1/2
HLM	Humane levermikrosomer
HPLC	Høytrykks-væsekromatografi
Iso-OMPA	Tetraisopropyl pyrofosforamid
K	Ratekonstant
Kap	Kapittel
LAR	Legemiddelassistert rehabilitering
LC-MS/MS	Væsekromatografi med tandem massespektrometri
LOD	Laveste dektekssjonsnivå
M3G	Morfin-3-glukuronid
M6G	Morfin-6-glukuronid
MeOH	Metanol

NaCl	Natriumklorid
NADP <sup>+</sup> / NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat
Neostigmin	3-(N,N-Dimethylcarbamoyloxy)-N,N,N,-trimetylanilinium bromid
REK	Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk
rpm	Runder per minutt
Rt	Retensjonstid
SEM	Standardfeil fra gjennomsnittet
Std	Standard
T <sub>1/2</sub>	Halveringstid
Tmax	Tid for Cmax
U	Enheter
UDPGA	Uridin 5'-difosfat-glukuronsyre
UDP-GT	Uridin 5'-difosfat- glukuronosyltransferase



# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Introduksjon .....</b>	<b>14</b>
1.1	Rusmiddelet heroin.....	14
1.1.1	Historien til heroin .....	14
1.1.2	Samfunnsbelastninger som følge av heroinmisbruk .....	14
1.2	Heroinets metabolisme og kjemiske egenskaper.....	15
1.2.1	Heroinetsyntese .....	15
1.2.2	Heroinmetabolisme .....	15
1.2.3	Enzymer involvert i heroinmetabolisme .....	17
1.3	Effekter av heroin i hjernen .....	18
1.4	Inhibering av heroinmetabolisme .....	19
1.5	Lever som <i>in vitro</i> -modell for studier av heroinmetabolisme .....	22
1.6	Masteroppgaven i et større perspektiv .....	23
1.7	Mål med studien .....	24
<b>2</b>	<b>Materialer og metoder .....</b>	<b>25</b>
2.1	Kjemikalier .....	25
2.2	Humant biologisk materiale.....	26
2.2.1	Levervev .....	26
2.2.2	Levermikrosomer .....	26
2.2.3	Blod .....	26
2.3	Homogenisering av humant levervev .....	27
2.4	<i>In vitro</i> metabolisme av heroin og 6-MAM i humant leverhomogenat.....	28
2.4.1	Heroinmetabolisme i humant leverhomogenat .....	28
2.4.2	Inhibering av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat .....	28
2.4.3	6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat .....	29
2.4.4	Inhibering av 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat .....	29
2.5	<i>In vitro</i> heroinmetabolisme i humane levermikrosomer.....	30
2.5.1	Heroinmetabolisme i humane levermikrosomer .....	30
2.5.2	Inhibering av heroinmetabolisme i humane levermikrosomer.....	30
2.6	Påvisning av glukuronidering .....	31
2.6.1	Påvisning av glukuronider i humant leverhomogenat.....	31
2.6.2	Påvisning av glukuronider i humane levermikrosomer.....	31

2.7	Tillaging av standarder og kontroller .....	31
2.8	Prøveopparbeidelse.....	33
2.8.1	Prøveopparbeidelse av leverhomogenat .....	33
2.8.2	Prøveopparbeidelse av levermikrosomer .....	33
2.9	LC-MS/MS-analyse.....	33
2.10	Dataanalyse .....	34
2.10.1	Kinetikk.....	34
2.10.2	Statistikk.....	34
<b>3</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>35</b>
3.1	Heroinmetabolisme i humane leverpreparater.....	35
3.1.1	Heroinmetabolisme i humant leverhomogenat .....	35
3.1.2	Inhibering av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat .....	36
3.1.3	Heroinmetabolisme i humane levermikrosomer .....	39
3.1.4	Inhibering av heroinmetabolisme i humane levermikrosomer.....	40
3.2	6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat .....	43
3.2.1	6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat .....	43
3.2.2	Inhibering av 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat .....	45
3.3	Glukuronidering.....	47
3.4	Interindividuelle forskjeller i heroinmetabolisme .....	48
<b>4</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>49</b>
4.1	Heroinmetabolisme i humane leverfraksjoner.....	49
4.2	Esteraser involvert i hepatisk heroinmetabolisme .....	50
4.3	Studier av heroinmetabolisme med humant materiale vs. rottevev .....	53
4.4	Interindividuell variasjon i heroinmetabolisme .....	55
<b>5</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>56</b>
	<b>Litteraturliste.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Vedlegg .....</b>	<b>64</b>
6.1	LC-MS/MS-betingelser .....	64
6.2	Data fra studier med humant blod .....	66
6.3	Data fra studier med perfundert rottelever .....	66

# 1 Introduksjon

## 1.1 Rusmiddelet heroin

### 1.1.1 Historien til heroin

Heroin ble først syntetisert i 1874 av den engelske kjemikeren Charles Alder Wright, og ble hevdet å ha en mer intens og mindre avhengighetsskapende effekt enn morfin. Heroin ble introdusert på markedet i 1898, og ble da markedsført som et hostelindrende legemiddel rettet mot pasienter med lungesykdommer som astma og bronkitt (se Figur 1.1). Nye studier fremkom som knuste oppfatningen om at heroin var lite avhengighetsdannende, men år med uregulert salg av heroin og dermed lett tilgjengelighet hadde startet en heroinavhengighetsepidemi i USA. Epidemien traff Europa på et senere tidspunkt da reguleringen av legemidler her var strengere. Først i 1924 ble det vedtatt medisinsk forbud mot heroin i USA. Årsakene til at heroin ble så populært skyldtes enklere administrering og høyere potens enn morfin, samt at heroin var lettere tilgjengelig enn opioid-analogen kodein som følge av at heroin var fritt omsettelig (Higby 1986; Scott 1998; Sneader 1998).



**Figur 1.1:**  
Heroinbeholder  
fra 1800-tallet  
produsert av det  
tyske firmaet  
Bayer.

I dag brukes morfin mye i klinisk praksis, mens heroin er et illegalt opioid som står for mesteparten av ikke-medisinsk opiatbruk i Norge. Både heroin og morfin er begge effektive smertestillende midler, men produserer også uønskede effekter som respirasjonsdepresjon, toleranse og avhengighet (Selley et al. 2001). Derfor er erstatninger ettertraktet, men opioidene har vist seg å være unike som analgetika.

### 1.1.2 Samfunnsbelastninger som følge av heroinmisbruk

Misbruk av narkotiske stoffer er forbundet med en rekke negative konsekvenser, blant annet sosiale og helsemessige problemer. Spesielt hyppig oppstår narkotikarelaterte problemer hos personer som injiserer forbindelsene i blodet. Ofte er det tynge rusmisbrukere som anvender denne administrasjonsruten, hvorav heroinmisbrukere utgjør en stor andel. Heroin er ansett å være et av de mest avhengighetsskapende rusmidlene vi vet om (Anthony et al. 1994), og injiserende heroinister topper statistikken for antall overdosedødsfall i Europa. Med 50

omkomne per million er Norge et av de landene i Europa som har flest narkotikarelaterte dødsfall per innbygger, hvorav opiatere er involvert i 80 % av disse. I tillegg utgjør sprøytebruk en høy risiko for overføring av infeksjonssykdommer som HIV og hepatitt C (EMCDDA 2014). Heroinmisbruk er også ofte forbundet med annen kriminalitet som bidrar til å ytterligere belaste samfunnet økonomisk.

## 1.2 Heroins metabolisme og kjemiske egenskaper

### 1.2.1 Heroinsyntese

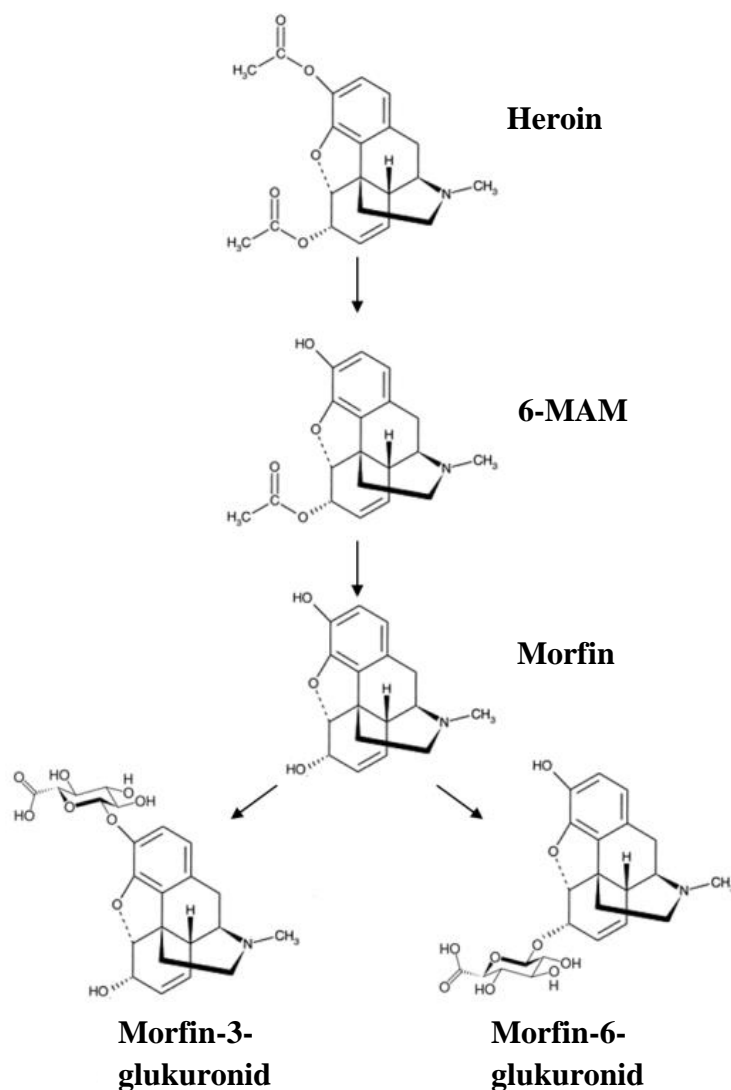
Morfinmolekyler finnes naturlig i lateksen<sup>1</sup> i frøkapslene til Opiumsvalmuen (*Papaver somniferum*) og kan ekstraheres herfra. Under fremstilling av heroin brukes eddiksyreanhydrid som acetylerende reaktant, hvor morfins to hydroksyl-grupper (posisjon 3 og 6, se Figur 1.2) blir acetylet ved høye temperaturer (Klemenc 2002). Produktet heroin har økt hydrofobisitet (Cornford et al. 1982; Oldendorf et al. 1972).

### 1.2.2 Heroinmetabolisme

Heroin utøver ruseffekter i hjernen via aktive metabolitter og fungerer derfor som et «prodrug» (Andersen et al. 2009; Gottås et al. 2013; Inturrisi et al. 1983; Selley et al. 2001). Etter administrering blir heroin raskt metabolisert av esteraser ved sekvensiell deacetylering til 6-monoacetylmorfin (6-MAM), som tregere omdannes videre til morfin (Andersen et al. 2009; Gottås et al. 2013; Rook et al. 2006a; Way et al. 1960; Way et al. 1965). Morfin blir ytterligere omdannet ved glukuronidering til farmakologisk aktive morfin-6-glukuronid (M6G) og inaktive morfin-3-glukuronid (M3G) (Glare & Walsh 1991; Milne et al. 1996; Rook et al. 2006a) (se Figur 1.2). Morfinglukuronider er hydrofile forbindelser som hovedsakelig skilles ut via urin (Rook et al. 2006a). Det er også påvist at cytokrom P450 (CYP)-enzymer kan omdanne morfin videre til metabolitten normorfin (Projean et al. 2003).

---

<sup>1</sup> Melkeliknende væske hos blomsterplanter



**Figur 1.2:** Metabolisme av heroin til metabolittene 6-MAM, morfin, M3G og M6G.

Dyrestudier har antydnet at heroin etter intravenøs injeksjon raskt omdannes i blodet til 6-MAM (Boix et al. 2013; Gottås et al. 2013). Selv om heroin er veldig lipofilt og har god permeabilitet gjennom blod-hjernebarrieren (Oldendorf et al. 1972), vil bare en liten fraksjon av heroindosen nå hjernen. Det kan skyldes at metaboliseringsraten til heroin i blod fremstår som svært høy; mye høyere enn heroins overføringsrate til hjernen. I stedet er det påvist at 6-MAM dannet perifert raskt krysser blod-hjernebarrieren (Boix et al. 2013). Den effektive leveringen av aktive metabolitter til hjernen har blitt brukt som en forklaring på de sterke avhengighetsskapende egenskapene til heroin, hvor 6-MAM er antatt å være den viktigste aktive metabolitten som medierer akutte ruseffekter (Andersen et al. 2009; Bogen et al. 2014; Boix et al. 2013; Gottås et al. 2013).



### 1.2.3 Enzymer involvert i heroinmetabolisme

Esteraser er hydrolaser som splitter esterbindinger, og er viktige for biotransformasjonen av mange fremmedstoffer. Enzymene er utbredt i de fleste vev og organer, og er spesifikke for visse substrater og inhibitorer. Heroin har to estergrupper (C-3<sup>2</sup> og C-6, se Figur 1.2) og er derfor et substrat for esteraser. Esterasene er klassifisert i tre grupper: kolinesteraser, karboksylesterase (CE) og paraoksonase. Studier med forsøksdyr har indikert at deacetyleringen av heroin til 6-MAM katalyseres av kolinesteraser (Lockridge et al. 1980; Salmon et al. 1999) og CE (Pindel et al. 1997), men store artsforskjeller i esteraseaktivitet er påvist (Berry et al. 2009). De samme enzymene katalyserer omdannelse av 6-MAM til morfin (Kamendulis et al. 1996; Qiao et al. 2014).

Paraoksonase har blitt isolert fra plasma og lever, og har vist annen substratspesifisitet enn kolinesteraser og CE. I blodet finnes også albumin som har esteraseaktivitet (Li et al. 2005). Både paraoksonase og albumin finnes i høye nok konsentrasjoner til å kunne bidra signifikant til ester-hydrolyse i plasma hos både mennesker og gangere (Li et al. 2005; Liederer & Borchardt 2006), men er ikke kjente heroinmetaboliserende enzymer. Det foreligger mye litteratur om esterase, for oppsummeringsartikler anbefales Klaassen et al. (2008), Liederer & Borchardt (2006) og Williams (1985).

#### Karboksylesteraser

Karboksylesteraser er ~ 60 kDa glykoproteiner og er tilstede i mange vev. Hos mennesker har karboksylesterase høyest aktivitet i leveren, hvor det høyeste nivået finnes i endoplasmatisk retikulum (ER), men aktivitet i lysosomer og cytosol er også betydelig (Klaassen et al. 2008; Williams 1985). Det finnes flere isoformer av karboksylesterase, men hovedsakelig to isoformer, hCE1 og hCE2, hydrolyserer den største andelen av eksogene estere og amider i mennesker (Klaassen et al. 2008). hCE1 finnes i spesielt høye nivåer i leveren, hCE2 finnes også her, men i lavere nivåer. Likevel er hCE2 mer aktiv enn hCE1 med hensyn til å hydrolysere heroin. Karboksylesterase har et katalytisk sete som inneholder en nukleofil serinresidu som deltar i hydrolysen. Derfor kalles disse enzymene også serin-esteraser (Klaassen et al. 2008; Liederer & Borchardt 2006).

---

<sup>2</sup> Karbonatom nummer 3

## Kolinesteraser

Acetylkolinesterase (AChE) og butyrylkolinesterase (BChE) er beslektede esteraser som har høy affinitet for henholdsvis acetylkolin og butyrylkolin. BChE kan hydrolysere mange andre forbindelser i tillegg, inkludert heroin og ulike legemidler. Begge enzymene eksisterer i flere ulike isoformer med ulik utbredelse. AChEs mest studerte effekt er terminering av nevrotransmisjon via nevrotransmitteren acetylkolin i hjernen. Kolinesteraser er som karboksylesterase også serin-esteraser (Klaassen et al. 2008; Liederer & Borchardt 2006; Williams 1985).

## UDP-glukuronosyltransferase

Glukuronidering av morfin til M3G og M6G katalyseres av enzymet UDP-glukuronosyltransferase (UDP-GT). Dette enzymet har høyest aktivitet i leveren, men glukuronidering av morfin kan også forekomme i mindre grad i nyrer, hjernen og tarmen. UDP-GT krever kofaktoren uridin 5'-difosfat-glukuronsyre (UDPGA) for katalytisk aktivitet, og er lokalisert hovedsakelig i ER (Cappiello et al. 1991).

## 1.3 Effekter av heroin i hjernen

Etter kryssing av blod-hjernebarrieren utøver opioider farmakologiske effekter ved å binde til opioidreseptorer i hjernen. Det finnes tre opioid-reseptorklasser,  $\mu$ ,  $\delta$  og  $\kappa$ , hvis ligander bindes med høy spesifisitet og affinitet (Goldstein & Naidu 1989; Johnson & North 1992), og som alle er G-proteinkoplede reseptorer (Brownstein 1993). Heroin, 6-MAM og morfin er  $\mu$ -opioidreseptoragonister, derfor utøves heroin-effektene hovedsakelig gjennom  $\mu$ -opioidreseptoren (Williams et al. 2013). Opioidene aktiverer  $\mu$ -opioidreseptorene og stimulerer dermed frigjøring av nevrotransmitteren dopamin i nucleus accumbens<sup>3</sup> (Figur 1.3). Denne frigjøringen skjer via hjernens «belønningssystem» som medierer eufori og belønning samtidig som den bidrar til forsterkende adferd<sup>4</sup> (Hyman 2005).

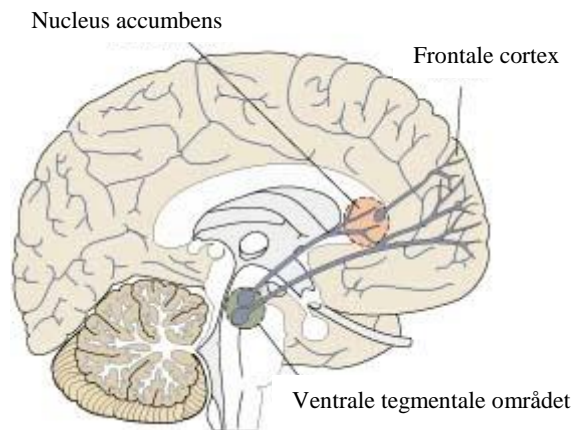
Fri hydroksylgruppe ved posisjon C-3 hos opioidene er kritisk for binding til opioidreseptoren. Opioidreseptoren er stereospesifikk slik at effektene av ulike opioider skyldes ulik affinitet til reseptoren (Inturrisi et al. 1983). 6-MAM, morfin og M6G har en fri

---

<sup>3</sup> Nucleus accumbens er en struktur i hjernen bestående av en samling nevroner som har et ytre skall og en indre kjerne

<sup>4</sup> Forsterkende adferd er viktig for utviklingen av avhengighet

hydroksylgruppe på C-3, mens heroin mangler denne frie hydroksylgruppen og har lav bindingsaffinitet (Inturrisi et al. 1983; Pert 1976) og effekt (Selley et al. 2001) ved  $\mu$ -opioidreseptorene. 6-MAM bindes til opioidreseptorene med omtrent samme affinitet som morfin (Inturrisi et al. 1983), men med større effekt (Selley et al. 2001).



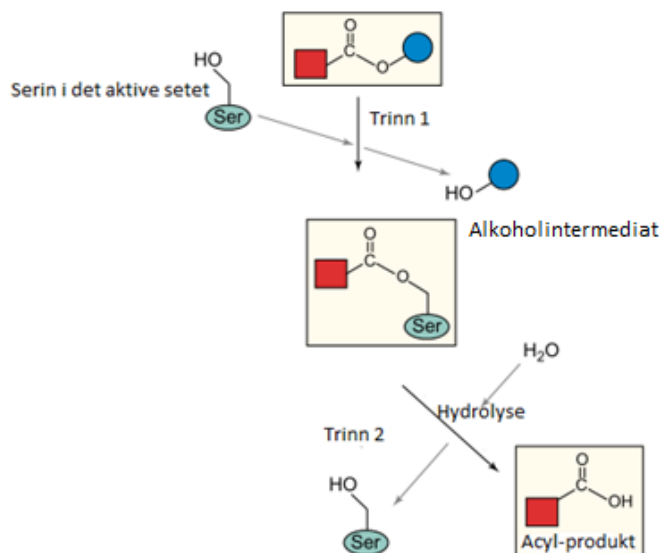
**Figur 1.3:** Lengdesnitt gjennom menneskets hjerne med angivelse av de viktigste strukturene som inngår i hjernens belønningssystem.

## 1.4 Inhibering av heroinmetabolisme

Enzym-inhibitorer kan brukes som verktøy for å påvise enzymeres medvirkning i metabolisme. Metoden baserer seg på prinsippet om at enzymene har ulik spesifisitet og spesifikke substrat-enzym-interaksjoner med forskjellige inhibitorer. Substratspesifisitet hos CE og kolinesteraser avhenger av flere faktorer som blant annet substratstørrelse, tilgjengeligheten til estergruppen, grad av hydrofobisitet hos forbindelsen og interaksjonen mellom molekylet og aminosyre-residuen i det aktive setet. I denne masteroppgaven ble inhibitorene Benzylisatin, BNPP, BW284c51, Neostigmin, Ethopropazin og Iso-OMPA benyttet for å identifisere esteraser involvert i human heroinmetabolisme (se Tabell 1.1). Studier har indikert konsentrasjonsavhengig spesifisitet hos inhibitorene (Atack et al. 1989; Grubič et al. 1988; Hyatt et al. 2007; Pindel et al. 1997; Salmon et al. 1999), noe som må tas hensyn til i studier med esteraseinhibitorer.

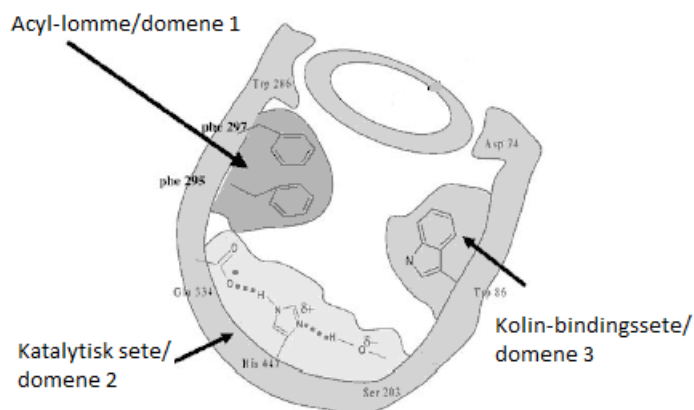
Mekanismen for den hydrolytiske reaksjonen er konserverert hos alle serin-esteraser (se Fig 1.4), hvor inhibitorene kan påvirke ulike komponenter i reaksjonen. Hydrolysen krever vann som ko-reaktant og utføres av en trio av katalytiske aminosyrer i det aktive setet: serin, histidin og glutamat. Reaksjonen skjer via to trinn: 1) serinresiduen til esterasen mottar acylgruppen til substratet, og et alkoholprodukt (evt kolinprodukt) forlater det aktive setet til

enzymet. 2) Et nukleofilt vannmolekyl spalter intermediet, slik at produktet frigjøres som karboksylsyre, og enzymet gjenoppretter sin originale tilstand (Alexander et al. 1963; Schwardt et al. 2005).



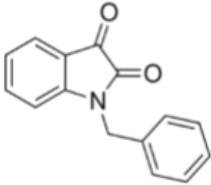
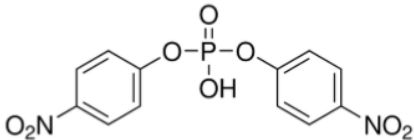
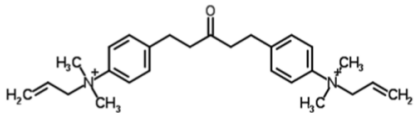
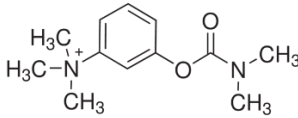
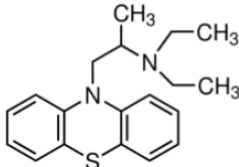
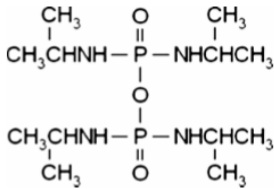
**Figur 1.4:** To-trinns katalytisk mekanisme for karboksylesterase. Substituent-gruppene på substratet er indikert som en rød firkant og en blå sirkel. I trinn 1 mottar serinresiduen til enzymet acyl-gruppen til substratet, og et alkoholprodukt forlater det aktive setet til enzymet. I trinn 2 overføres acetylgruppen fra enzymet til et vannmolekyl og produktet frigjøres (Revidert fra Schwardt et al. 2005).

Selektivitet mot AChE eller BChE skyldes tre distinkte domener i kolinesterase-strukturen, hvor kritiske sidekjeder gir opphav til AChE- og BChE-spesifisitetsforskjeller. Hver av de tre domenene er definert av en samling aromatiske residuer hvis sammensetning forårsaker selektivitet, se Figur 1.5 (Radic et al. 1993).



**Figur 1.5:** Det aktive setet til kolinesterase (her representert ved AChE) med anvisning til domenene ansvarlige for binding av forbindelser.

**Tabell 1.1:** Virkningsmekanisme og molekylstruktur for esteraseinhibitorer benyttet i denne masteroppgaven.

Inhibitor	Målenzym	Virkningsmekanisme	Molekylstruktur
Benzyllisatin	CE	Aromatisk dion (Benzil-analog) som binder det aktive setet. Reversibel hemmer. (Schwardt et al. 2005)	
BNPP	CE	Organofosfat som kovalent binder serinresiduen i det aktive setet. Irreversibel hemmer. (Schwardt et al. 2005)	
BW284c51	AChE	Biskvarternær inhibitor som interagerer med tyrosin og tryptofan i domene 2. Reversibel hemmer. (Radic et al. 1993)	
Neostigmin	AChE	Karbamat som fungerer som et «falskt substrat» og hemmer trinn 2 i hydrolysen. Reversibel hemmer. (Alston 2008)	
Ethopropazin	BChE	Trisyklisk inhibitor som interagerer med glutamat og tryptofan i domene 3. Reversibel hemmer. (Radic et al. 1993)	
Iso-OMPA	BChE	Alkyl-fosfat som interagerer med alifatiske residuer i domene 1. Irreversibel hemmer. (Radic et al. 1993)	

## 1.5 Lever som *in vitro*-modell for studier av heroinmetabolisme

De fleste studier av heroinmetabolisme er utført ved bruk av forsøksdyr, primært rotter og mus. Studier med humant materiale har økt human relevans sammenliknet med studier hvor forsøksdyr er benyttet.

Leveren er kroppens viktigste organ for biotransformasjon av eksogene forbindelser. Flere *in vitro*-modeller for human lever har blitt utviklet, blant annet humane levermikrosomer, bruk av levervev, cytosol og S9-fraksjon<sup>5</sup> (Brandon et al. 2003). En generell fordel med denne typen modeller er at studiesystemet har redusert kompleksitet.

### Leverhomogenat

I denne studien er det brukt homogenat av ikke-perfundert levervev, dvs at homogenatet inneholdt blod. Denne typen *in vitro*-modell har tidligere kun blitt brukt av Way et al. (1965) i forbindelse med heroinstudier. Generelt eksisterer svært lite litteratur som beskriver bruken av homogenisert ikke-perfundert human lever i forskning. Det er rimelig å anta at denne modellen har høy *in vivo*-relevans, da mange leverkomponenter beholdes i systemet. Ulemper ved denne typen modell er blant annet påvirkningen av blod, samt at det også finnes en risiko for at resultatene kan bli påvirket av sykdom og medikamenter, da levervevet brukt i denne oppgaven ble donert fra syke pasienter. I tillegg involverer homogenisering av vevet at celle- og vevsstruktur oppheves.

### Levermikrosomer

Humane levermikrosomer (HLM) er en populær *in vitro*-modell for studier av biotransformasjon. Utbredt bruk skyldes blant annet at HLM både er billig og kommersielt lett tilgjengelig, men også enkelt kan produseres på eget laboratorium. HLM er en enkel modell som kan gi gode indikasjoner på den metabolske profilen til en rekke enzymer, og er et av de best karakteriserte *in vitro*-systemene for forskning på biotransformasjon av legemidler (Brandon et al. 2003; Yan & Caldwell 2003).

---

<sup>5</sup> En cellefraksjon fremstilt ved å sentrifugere leverhomogenat ved 10,000 g, som inneholder både mikrosomer og cytosol.

Levermikrosomer består av vesikler fra ER i hepatocytene og kan fremstilles ved differensiell sentrifugering av levervev (Nelson et al. 2001; von Jagow et al. 1965). HLM inneholder svært høye enzymnivåer, spesielt av enzymene CYP og UDP-GT. Ved bruk av kommersielle HLM unngås interindividuelle variasjoner i enzymaktivitet. Enzymaktiviteten er representativ for den humane populasjonen på grunn av at mikrosomene som kjøpes ofte er fremstilt fra mange donorer (for eksempel 200 donorer) (Brandon et al. 2003). Ulemper ved bruk av HLM er blant annet at enzymkonsentrasjonene er kunstig høye, samt at interaksjoner med andre cellulære komponenter elimineres under isoleringsprosessen.

## **1.6 Masteroppgaven i et større perspektiv**

Denne oppgaven er en del av et større prosjekt som utføres på avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling, Divisjon for rettsmedisinske fag, på Nasjonalt folkehelseinstitutt. Prosjektets hovedfokus er basalforskning innen feltet heroinmetabolisme, både humant og ved bruk av forsøksdyr. Forskningen er også viktig for prosjektets sekundære fokus; behovet for nye, alternative behandlingsstrategier for heroinmisbruk og –avhengighet. Metadon og buprenorfin som i dag brukes i legemiddelassistert rehabilitering (LAR) viser avhengighetsutvikling, samt at det er en økende bekymring for potensielle negative effekter av metadon på kognitive funksjoner (Prosser et al. 2006; Prosser et al. 2009; Verdejo et al. 2005).

Dagens farmakoterapi er rettet mot opioidreseptorene i hjernen, hvor effektene av heroin enten blokkeres eller imiteres. En ny, alternativ strategi med mindre risiko for bivirkninger i sentralnervesystemet er farmakoterapi rettet mot rusmolekylet i seg selv, med den hensikt å redusere substanskonsentrasjonen ved målområdet og dermed minimere en farmakodynamisk effekt (Gorelick 2012). Dette kan oppnås ved immunterapi, hvor antistoffer binder rusmolekylet i blodbanen (Bogen et al. 2014), eller ved enzymterapi hvor administrering av et heroinmetaboliserende enzym akselererer omdannelsen av 6-MAM til den mindre aktive metabolitten morfin. For mer informasjon om disse alternative behandlingsstrategiene henvises leseren til Bogen et al. (2014), Brimijoin (2011) og Zlebnik et al. (2014).

## 1.7 Mål med studien

Tidligere studier av heroinmetabolisme er nesten utelukkende gjort med forsøksdyr da humane studier av heroinmetabolisme ikke er etisk forsvarlig. Betydelige artsforskjeller i aktivitet og lokalisasjon av enzymer involvert i heroinmetabolisme kompliserer ekstrapolering mellom forsøksdyr og menneske, og kunnskap om human heroinmetabolisme er mangelfull. Det overordnede målet med denne masteroppgaven var å øke kunnskapen om human heroinmetabolisme ved å studere metabolisme av heroin *in vitro* i humane leverpreparater. Leveren er av spesiell interesse fordi dette organet er beskrevet som svært aktivt i deacetylering av heroin (Way et al. 1965). Heroinmetabolisme ble studert i humant leverhomogenat og humane levermikrosomer, og væskechromatografi med tandem massespektrometri (LC-MS/MS) ble brukt for kvantifisering av heroin og heroin-metabolitter.

Identifisering og lokalisering av enzymer involvert i human hepatisk heroinmetabolisme er viktig for å forstå hvordan heroin metaboliseres *in vivo* i menneske. Kartlegging av aktive esteraser kan bidra til å karakterisere artsforskjeller i heroinmetabolisme, samt øke forståelsen av interindividuell variasjon i nedbrytning av heroin. Videre er studier av esteraseaktivitet viktig for å vurdere i hvilken grad gnagere er gode modellorganismer for studier av human heroinmetabolisme. Detaljert kunnskap om human heroinmetabolisme kan bidra til utvikling av nye farmakokinetiske behandlingsstrategier for heroinavhengighet og –overdose.

Mer spesifikt kan de nevnte temaene brytes ned til følgende spørsmål som vil bli forsøkt besvart i denne masteroppgaven:

- *Hvilken kvantitativ betydning har leveren for human in vivo heroinmetabolisme?*
- *Hvilke esteraser er viktige for human hepatisk heroinmetabolisme?*
- *Kan humane levermikrosomer erstatte bruk av humant leverhomogenat som in vitro-modell for studier av human hepatisk heroinmetabolisme?*
- *Er rotter gode modellorganismer for studier av heroinmetabolisme i menneske?*
- *Eksisterer interindividuell variasjon i hepatisk heroinmetabolisme hos mennesker?*



## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Kjemikalier

**Tabell 2.1:** Kjemikalier og leverandører.

<b>Kjemikalier</b>	<b>Leverandør</b>
6-MAM	Lipomed AG, Sveits
6-MAM d6	Cerilliant Corporation, Texas
BNPP	Sigma Aldrich, Tyskland
BW284c51	Sigma Aldrich, Tyskland
Ethopropazin hydroklorid	Sigma Aldrich, Tyskland
Heroin	Lipomed AG, Sveits
Heroin d9	Cerilliant Corporation, Texas
Iso-OMPA	Sigma Aldrich, Tyskland
M3G	Sigma Aldrich, Tyskland / Lipomed AG, Sveits
M3G d3	Lipomed AG, Sveits
M6G	Lipomed AG, Sveits
M6G d3	Cerilliant Corporation, Texas
Morfin	Lipomed AG, Sveits
Morfin d6	Cerilliant Corporation, Texas
NADPH regenerating system Solution A	Corning Incorporated, NY, USA
NADPH regenerating system Solution B	Corning Incorporated, NY, USA
N-Benzylisatin	Sigma Aldrich, Tyskland
Neostigminbromid	Sigma Aldrich, Tyskland
Normorfin	Lipomed AG, Sveits
UDPGA	Sigma Aldrich, Tyskland

Alle andre kjemikalier ble levert av standard kommersielle leverandører. Vannet var renset med et Milli-Q-system (EMD Millipore, MA, USA), og vil videre kun refereres til som MQ-vann.

## **2.2 Humant biologisk materiale**

Rutiner for arbeid med potensielt smittefarlig materiale ble fulgt under arbeid med humane leverpreparater. Arbeidet ble utført på eget laboratorium for smittefarlig materiale.

### **2.2.1 Levervev**

Levervev ble innsamlet ved Intervensjonssenteret, Oslo Universitetssykehus HF, og er fra begge kjønn. Før innsamling av humant levervev ble det søkt om godkjenning fra Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK). Etter godkjenning ble informasjonsskriv og samtykkeerklæring utdelt og undertegnet av pasientene i forkant av studien. Vevet ble anonymisert.

Pasientene hadde alle ulike leversykdommer, de fleste kreft, som gjorde det nødvendig med kirurgisk inngrep hvor områder av leveren ble skåret ut. I alle tilfellene ble det skåret ut et område med «friskt» vev rundt leverlesjonen for å forsikre at alt sykt vev ble fjernet. Biopsier fra det avskårede friske vevet ble brukt til studier i denne masteroppgaven. Medikamenter pasientene brukte og vevet potensielt inneholdt under studiene er listet opp i Tabell 2.2. Vevet ble oppbevart på tørris like etter uttak, og lagret ved -80 °C før bruk.

### **2.2.2 Levermikrosomer**

Humane levermikrosomer (20 mg/mL i 250 mM sukrose) ble kjøpt fra TebuBio (XenoTech, Danmark). Mikrosomene ble fremstilt fra post mortem levervev donert av 200 mennesker av begge kjønn (XTreme200 Pool), som ble blandet og fordelt ut for salg. Enzymaktiviteten er karakterisert av leverandør. Tilsetning av nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat (NADPH) er standard betingelse ved bruk av HLM for å møte enzymenes energikrav. Mikrosomene ble lagret ved -80 °C før bruk.

### **2.2.3 Blod**

Blod (2 g NaF, 1,6 mL heparin og 10 mL RO-vann per 450 mL blodbankblod) brukt i standarder og kontroller (se kap. 2.7) ble kjøpt fra Oslo Universitetssykehus HF. Blodet ble oppbevart ved 4 °C før bruk.

**Tabell 2.2:** Pasientinformasjon

Pasient	Sykdomsbehandling	Medikamenter i forbindelse med operasjon
<b>1</b>	Har ikke fått kjemoterapi siste år. Pasient stod på følgende legemidler: Selo-Zok, Lipitor, Albyl-E, jerntabletter.	Ultiva, Propofol-Lipuro, Nimbex, Efedrin, Atropin, Fortecortin, Metronidazol, Doksosyklin.
<b>2</b>	Har ikke fått kjemoterapi siste år.	Ultiva, Propofol-Lipuro, Esmeron, Efedrin, Atropin, Fortecortin.
<b>3</b>	Har fått kjemoterapi 4 uker før operasjon.	Paracetamol, Remifentanyl, Propofol-Lipuro, Nimbex, Cyklokapron, Fortecortin, Efedrin, Fenylefrin, kalsiumklorid, noradrenalin, plasma, SAG M-erytrocytter, Doxyferm, Flagyl, Albumin Baxter.
<b>4</b>	Pasient stod på følgende medikamenter: NovoRapid, Insulatard, Metformin, Albyl-E, Zelo-Sok, Adalat Oros, Zocor, Zofran, Duroferon, B-12 injeksjoner.	Vival, Propofol-Lipuro, Remifentanyl, Fentanyl, Toradol, Deksametason, Nimbex.
<b>5</b>	-	Vival, Fragmin, Remifentanyl, Propofol-Lipuro, Paracetamol, Deksametason, Efedrin, Nimbex, Toradol, Glykopyrroniumbromid-Neostigminmetylsulfat, Fentanyl.
<b>6</b>	Pasient har fått kjemoterapi i forkant av operasjon.	Vival, Remifentanyl, Propofol-Lipuro, Paracetamol, Deksametason, Efedrin, Nimbex, Ketorolak, Fentanyl.

## 2.3 Homogenisering av humant levervev

Humant levervev ble homogenisert i Tris Krebs-buffer (10 mM Tris, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM glukose, 1,0 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) i forholdet 2 mL per gram vev. Når tilfredsstillende homogenisering var oppnådd med kniv-homogenisator (T 10 basic ULTRA-TURRAX®, IKA®) ble homogenatet overført til glass/teflon-homogenisator (EUROSTAR power-b, IKA®) hvor homogenatet ble ytterligere homogenisert med en hastighet på opptil 1700 rpm, med varierende antall strøk (ca 10-20). Leverhomogenatet ble umiddelbart fryst i flytende nitrogen, og lagret i fryser ved - 80 °C.

## **2.4 *In vitro* metabolisme av heroin og 6-MAM i humant leverhomogenat**

Heroin og 6-MAM ble løst i 0,9 % NaCl og oppbevart i kjøleskap ved 4 °C i hhv. maksimalt en og tre uker før bruk. Stabilitetsstudier utført i avdelingen har vist at heroin og 6-MAM løst i 0,9 % NaCl forblir stabilt i de nevnte tidsperiodene (upubliserte resultater). Inkubasjonstider, konsentrasjoner og forsøksbetingelser ble valgt på grunnlag av tidligere studier forsøk på avdelingen.

### **2.4.1 Heroinmetabolisme i humant leverhomogenat**

Homogenisert levervev (se kap. 2.3) ble fortynnet 1:1 med Tris Krebs-buffer.

Leverhomogenat ble tilsatt i plastrør (110 µL/rør) og preinkubert på vannbad (37 °C) i ca 10 minutter før tilsetning av 12 µL 5 µM heroinløsning (sluttkonsentrasjon 0,5 µM). Prøvene ble vortexet og inkubert på vannbad (37 °C) i henholdsvis 3, 5, 10, 15 og 30 sekunder, 1, 3, 10, 30 og 60 minutter, med to paralleller for hvert tidspunkt. Deretter ble 78 µL iskald 13 mM ammoniumformatbuffer (pH 3,1, sluttkonsentrasjon 5 mM) med natriumfluorid (NaF) (sluttkonsentrasjon 2 mg/mL) tilsatt for å avslutte reaksjonen. Iskald sur buffer brukes fordi heroin er mest stabil ved lave temperaturer og lav pH (Barrett et al. 1992). Natriumfluorid tilsettes for å inhibere esteraseaktivitet og dermed degradering av heroin og 6-MAM (Brogan et al. 1992). Rørene ble vortexet umiddelbart, fryst i flytende nitrogen og satt i fryser (- 80 °C) i maksimalt en time før prøveopparbeidelse. Etterfølgende prøveopparbeidelse er beskrevet i kap. 2.8.1. Forsøket ble gjentatt på fem ulike forsøksdager.

### **2.4.2 Inhibering av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat**

Homogenisert levervev (se kap. 2.3) ble fortynnet 1:1 med Tris Krebs-buffer.

Leverhomogenat ble tilsatt i plastrør (100 µL/rør) og tilført 10 µL esterasehemmere med sluttkonsentrasjoner på henholdsvis 10 µM og 100 µM (se Tabell 2.3), med to paralleller for hver hemmerkonsentrasjon. Etter preinkubering på vannbad (37 °C) i ca 15 minutter ble 12 µL 5 µM heroin tilsatt (sluttkonsentrasjonen 0,5 µM). Etter ti sekunder ble 78 µL iskald 13 mM ammoniumformatbuffer (pH 3,1, sluttkonsentrasjon 5 mM) med NaF (sluttkonsentrasjon 2 mg/mL) tilsatt for å avslutte reaksjonen. Rørene ble vortexet umiddelbart, fryst i flytende nitrogen og satt i fryser (- 80 °C) i maksimalt en time før prøveopparbeidelse. Etterfølgende prøveopparbeidelse er beskrevet i kap. 2.8.1. Forsøket ble gjentatt på fem ulike forsøksdager.

**Tabell 2.3:** Tilberedningsinformasjon om esterasehemmere.

Enzymhemmer	Konsentrasjon stamløsning	Stamløsning løst i:	Fortynnet i:	Sluttkonsentrasjon enzymhemmer
BW284c51	12,2 mM	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	10 µM og 100 µM
Iso-OMPA	12,2 mM	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	10 µM og 100 µM
BNPP	12,2 mM	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	10 µM og 100 µM
Neostigmin	12,2 mM	0,9 % NaCl	0,9 % NaCl	10 µM og 100 µM
Ethopropazin	2,49 mM	MQ-vann	0,9 % NaCl	10 µM og 100 µM
Benzylisatin	25 mM	Etanol	0,9 % NaCl	10 µM og 100 µM

Stamløsningene av esterasehemmerene ble løst i forskjellige løsemidler avhengig av løselighet: 0,9 % NaCl, etanol og MQ-vann. Derfor ble det under forsøkene inkludert løsningskontroller for å teste eventuell innvirkning av de ulike løsemidlene. Videre vil «kontroll» tilsvare kontrollprøver med tilsatt 0,9 % NaCl, «vann» tilsvare kontrollprøver med MQ-vann, og «etanol» tilsvare kontrollprøver tilsatt etanol (høyeste sluttkonsentrasjon 0,4 %).

### 2.4.3 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat

Fremgangsmåten fulgte samme oppsett som for studie av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat (se kap. 2.4.1). Leverhomogenat ble tilsatt 5 µM 6-MAM (sluttkonsentrasjon 0,5 µM), og prøvene ble så inkubert i henholdsvis 3, 5, 10, 15, 30 og 45 sekunder, 1, 2 og 5 minutter, med to paralleller per tidspunkt. Etterfølgende prøveoppbehandling er beskrevet i kap. 2.8.1. Forsøket ble utført på fem ulike forsøksdager.

### 2.4.4 Inhibering av 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat

Fremgangsmåten fulgte samme oppsett som for studie av inhibering av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat (se kap. 2.4.2). Leverhomogenat ble tilsatt 5 µM 6-MAM (sluttkonsentrasjon 0,5 µM) og inkubert i 45 sekunder. Etterfølgende prøveoppbehandling er beskrevet i kap. 2.8.1. Forsøket ble utført på fem ulike forsøksdager.

## **2.5 *In vitro* heroinmetabolisme i humane levermikrosomer**

### **2.5.1 Heroinmetabolisme i humane levermikrosomer**

Forsøksoppsettet ble basert på tidligere publiserte studier av Kuwayama et al. (2009) og Staack et al. (2004). Eppendorfrør ble tilsatt 80 µL NADPH-regenereringsløsning (5 deler løsning A + 1 del løsning B + 75 deler 100 mM fosfatbuffer (pH 7,4) tilsvarer: 1,3 mM NADP<sup>+</sup>; 3,3 mM glukose 6-fosfat; 0,4 U/mL glukose 6-fosfat dehydrogenase; og 3,3 mM MgCl<sub>2</sub>). Rørene ble så tilført 10 µL levermikrosomer (20 mg/µL) og satt på vannbad (37 °C) for preinkubasjon i 10 minutter. I hvert eppendorfrør ble 10 µL 5 µM heroin (sluttkonsentrasjon 0,5 µM) tilsatt. Rørene ble raskt vortexet og inkubert i henholdsvis 0, 15, 30 og 45 sekunder og 1, 1,5, 3, 5 og 10 minutter, med to paralleller for hvert tidspunkt. For å stoppe reaksjonen ble 20 µL blanding av maursyre (1,2 M) og internstandard (0,5 µM Heroin d9, Morfin d6, M3G d3 og 6-MAM d6) i forholdet 1:1 tilsatt. Rørene ble vortexet umiddelbart og satt på is. Etterfølgende prøveopparbeidelse er beskrevet i kap. 2.8.2. Forsøket ble gjentatt på fem ulike forsøksdager.

### **2.5.2 Inhibering av heroinmetabolisme i humane levermikrosomer**

Fremgangsmåten fulgte samme oppsett som for studie av heroinmetabolisme i humane levermikrosomer (se kap 2.5.1), men ble tilpasset tilsetning av esterasehemmere. Eppendorfrør ble tilsatt 90 µL NADPH-regenereringsløsning (se kap. 2.5.1), 10 µL levermikrosomer og 10 µL hemmere (sluttkonsentrasjon 10 eller 100 µM, se kap 2.4.2) og preinkubert på vannbad (37 °C) i 10 minutter. Deretter ble 10 µL 5,083 µM heroinløsning tilsatt (sluttkonsentrasjon 0,5 µM), før prøvene ble vortexet og inkubert i 20 sekunder. For å stoppe reaksjonen ble 24,4 µL blanding av maursyre (1,2 M) og internstandard (0,5 µM Heroin d9, Morfin d6, M3G d3 og 6-MAM d6) i forholdet 1:1 tilsatt. Rørene ble vortexet umiddelbart og satt på is. Etterfølgende prøveopparbeidelse er beskrevet i kap. 2.8.2. Forsøket ble utført på tre ulike forsøksdager.

## 2.6 Påvisning av glukuronidering

### 2.6.1 Påvisning av glukuronider i humant leverhomogenat

Fremgangsmåten fulgte samme oppsett som for studie av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat (se kap. 2.4.1). Humant leverhomogenat ble tilsatt 0 og 50  $\mu\text{M}$ , og 5 mM UDPGA (sluttkonsentrasjoner hhv. 0, 1, 10 og 100  $\mu\text{M}$  og 1 mM), med fire paralleller for hver konsentrasjon. Volum av Tris Krebs-buffer ble tilpasset slik at sluttkonsentrasjon av heroin ble 0,5  $\mu\text{M}$ . Prøvene ble inkubert i hhv. 1 og 10 minutter (to paralleller for hver inkuberingsperiode). Etterfølgende prøveopparbeidelse er beskrevet i kap. 2.8.1.

### 2.6.2 Påvisning av glukuronider i humane levermikrosomer

Fremgangsmåten fulgte samme oppsett som for studie av heroinmetabolisme i humane levermikrosomer (se kap. 2.5.1). Humane levermikrosomer ble tilsatt 0; 1,25; 12,5 og 125  $\mu\text{M}$  og 1,25 mM UDPGA (sluttkonsentrasjon hhv. 0, 1, 10 og 100  $\mu\text{M}$ , og 1 mM), med fire paralleller for hver konsentrasjon. Volum av NADPH-regenereringsløsning ble tilpasset slik at sluttkonsentrasjon av heroin ble 0,5  $\mu\text{M}$ . Prøvene ble inkubert i hhv. 1 og 10 minutter (to paralleller for hver inkuberingsperiode). Etterfølgende prøveopparbeidelse er beskrevet i kap. 2.8.2.

## 2.7 Tillaging av standarder og kontroller

For kvantifisering av heroin og heroin-metabolitter i humant leverhomogenat og humane levermikrosomer ble det laget standardkurver for å relatere konsentrasjonen av analytter i prøvene til konsentrasjonen i kjente standarder. Standarder og kontroller i forsøk med leverhomogenat ble tilsatt humant blod (se kap. 2.2.3), mens standarder og kontroller i forsøk med HLM ikke ble tilsatt biologisk materiale. Standarder og kontroller ble fortynnet fra stamløsning hver forsøksdag, og gjennomgikk prøveopparbeidelse parallelt med prøvene. Avvik fra teoretisk verdi var alltid  $< 20\%$  for standarder og kontroller. Heroin hadde separate standard- og kontrollløsninger for å kunne måle eventuelt innhold av 6-MAM i heroin-standardene/kontrollene<sup>6</sup>. Nye standard- og kontrolløsninger for heroin ble laget når 6-MAM-andelen i heroin-standardene/kontrollene målte mellom 5 og 10 % for å unngå stor variasjon i

---

<sup>6</sup> Spontan nedbrytning av heroin til 6-MAM.

heroinkonsentrasjonen. Standardkonsentrasjonene er presentert i Tabell 2.4. Ved tillaging av stamløsninger ble M3G og M6G løst i MQ-vann, morfin og 6-MAM i metanol (MeOH), og heroin i acetonitril (ACN). Alle videre fortynninger ble gjort med 5 mM NH<sub>4</sub>-formatbuffer (pH 3,1).

**Tabell 2.4:** Standardkonsentrasjoner i standardrekkene for forsøk med humane levermikrosomer og leverhomogenat.

<b>Standardrekke for analyse av heroin og heroin-metabolitter i levermikrosomer</b>							
<b>Konsentrasjon (µM)</b>	<b>Std 1</b>	<b>Std 2</b>	<b>Std 3</b>	<b>Std 4</b>	<b>Std 5</b>	<b>Std 6</b>	<b>Std7</b>
<b>M3G</b>	0,001	0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>M6G</b>	0,001	0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>Morfin</b>	0,001	0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>6-MAM</b>	0,001	0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>Heroin</b>	0,002	0,005	0,01	0,1	0,5	1,0	5,0
<b>Normorfin</b>		0,005	0,01	0,1	0,5	1,0	
<b>Standardrekke for analyse av heroin og heroin-metabolitter i leverhomogenat</b>							
<b>M3G</b>		0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>M6G</b>		0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>Morfin</b>		0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>6-MAM</b>		0,005	0,01	0,1	1,0	5,0	
<b>Heroin</b>		0,005	0,01	0,1	0,5	1,0	

Kontroller med kjente konsentrasjoner og nullprøver ble kjørt rutinemessig med hver serie for kvalitetskontroll. Kontrollene hadde konsentrasjoner på hhv. 0,5 µM og 0,05 µM uavhengig av opiat. Nullprøver ble inkludert for å kontrollere at reagenser eller biologisk materiale ikke forårsaket topper eller bakgrunnsstøy som påvirket kvantifiseringen. Alle løsninger ble oppbevart ved 4 °C og romtemperert før bruk.

For hver forsøksserie ble konsentrasjonen av administrert heroin/6-MAM målt i prøver hvor biologisk materiale var erstattet av buffer, som kvalitetssikring av tilsatt heroin/6-MAM-konsentrasjon.



## 2.8 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelse var nødvendig for å fjerne komponenter som kunne forstyrre kvantifiseringen av heroin og heroin-metabolitter ved LC-MS/MS.

### 2.8.1 Prøveopparbeidelse av leverhomogenat

Opparbeidelse ble utført som beskrevet i Karinen et al. (2009), men med visse justeringer. Prøvene ble tint på isvann og tilsatt 50 µL internstandard (0,5 µM Heroin d9, Morfin d6, M3G d3 og 6-MAM d6), før 500 mL iskald fellingsløsning (ACN/MeOH, 85:15) ble tilsatt. Prøvene ble så vortexet og satt i ristemaskin (VX-2500 Multi-Tube Vortexer, VWR®) i ett minutt, og deretter fryst (- 20 °C) i 10 minutter. Etter frysing ble prøvene sentrifugert ved 4 700 x g i 10 minutter ved 4 °C. Supernatanten ble overført til glassrør og inndampet med nitrogengass ved 40 °C i ca 60 min, til all væske var fordampet. Gjenværende pellet ble gjenoppløst i kald 100 µL ACN/5mM NH<sub>4</sub>-formatbuffer (3:97, pH 3,1) og satt i ristemaskin i ca ett minutt. Etter sentrifugering ved 3 800 x g i 10 minutter (4 °C) ble supernatanten overført til prøverør for autoinjektor for analyse på LC-MS/MS samme dag (se kap 2.9). Standarder, nullprøver og kontroller ble ekstrahert og analysert med hver forsøksserie, se kap. 2.7.

### 2.8.2 Prøveopparbeidelse av levermikrosomer

Umiddelbart etter tilsetting av maursyre/internstandard ble rørene sentrifugert i 15 minutter ved 14 500 x g i en bordeppendorfsentrifuge (MiniSpin® plus, Eppendorf AG) på kjølerom. Supernatanten ble overført til prøverør for autoinjektor og analysert samme dag ved bruk av LC-MS/MS (se kap. 2.9). Standarder, nullprøver og kontroller ble ekstrahert og analysert med hver forsøksserie, se kap. 2.7.

## 2.9 LC-MS/MS-analyse

Kvantifisering av heroin og heroin-metabolitter ble utført ved bruk av LC-MS/MS. Fremgangsmåten er beskrevet av Karinen et al. (2009). Metoden anvender omvendt fase kromatografi med en XTerra® MS C18 kolonne (Waters Corp., Milford, MA, USA) med sur mobilfase, kombinert med positiv elektroprayonisasjon (ESI) MS/MS-deteksjon. En strømningshastighet på 0,2 mL/min ble benyttet. Metoden kombinerer

separasjonsegenskapene til væskekromatografi med deteksjonsegenskapene til MS/MS, noe som gjør metoden svært presis, selektiv og sensitiv. For mer detaljert informasjon om LC-MS/MS-betingelser, se kap. 6.1.

## **2.10 Dataanalyse**

### **2.10.1 Kinetikk**

Den farmakokinetiske programvaren Kinetica v.5.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ble brukt for å analysere data fra studier av tidskurver for opioidene (se kap 2.4.1, 2.4.3, og 2.5.1). Verdiene fra hvert målte tidspunkt for hver pasient ble overført til Kinetica. Ved å bruke en enkel modell for lineær farmakokinetikk med tre avdelinger (heroin, 6-MAM, og morfin), med intravenøs bolus administrasjonsrute for heroin (6-MAM) og ekstravaskulær administrasjonsrute for 6-MAM og morfin, ble konsentrasjonsmaksimum ( $C_{max}$ ), tid for konsentrasjonsmaksimum ( $T_{max}$ ) og halveringstid ( $T_{1/2}$ ) kalkulert. For å finne ratekonstanter ( $K$ ) ble en enkel modell for lineær farmakokinetikk med tre avdelinger (heroin, 6-MAM, og morfin) med intravenøs bolus administrasjonsrute for heroin brukt. Gjennomsnittet av parameterne ble kalkulert og dataene presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM.

### **2.10.2 Statistikk**

Statistisk analyse ble utført med programvaren SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM.

Dataene ble først analysert med Levenes test for homogen varians. Dersom Levenes test var ikke-signifikant ble det utført enveis-ANOVA for hver inhibitor, testet mot løsningskontroll. Heroin, 6-MAM og morfin ble brukt som avhengige variabler, mens inhibitor ble satt som uavhengig variabel. Ved signifikant ANOVA ble det kjørt tosidet Dunnett post hoc test.

For sammenlikning av heroin/6-MAM-metabolisme mellom ulike studier ble  $T_{1/2}$  for heroin/6-MAM inkorporert i Levenes test. Ved ikke-signifikant Levens test ble det utført t-test. Ved signifikant Levenes test ble det gjort Welchs t-test med Satterthwaite kalkulering for frihetsgrader.

P-verdier  $\leq 0,05$  ble vurdert som statistisk signifikante.

## 3 Resultater

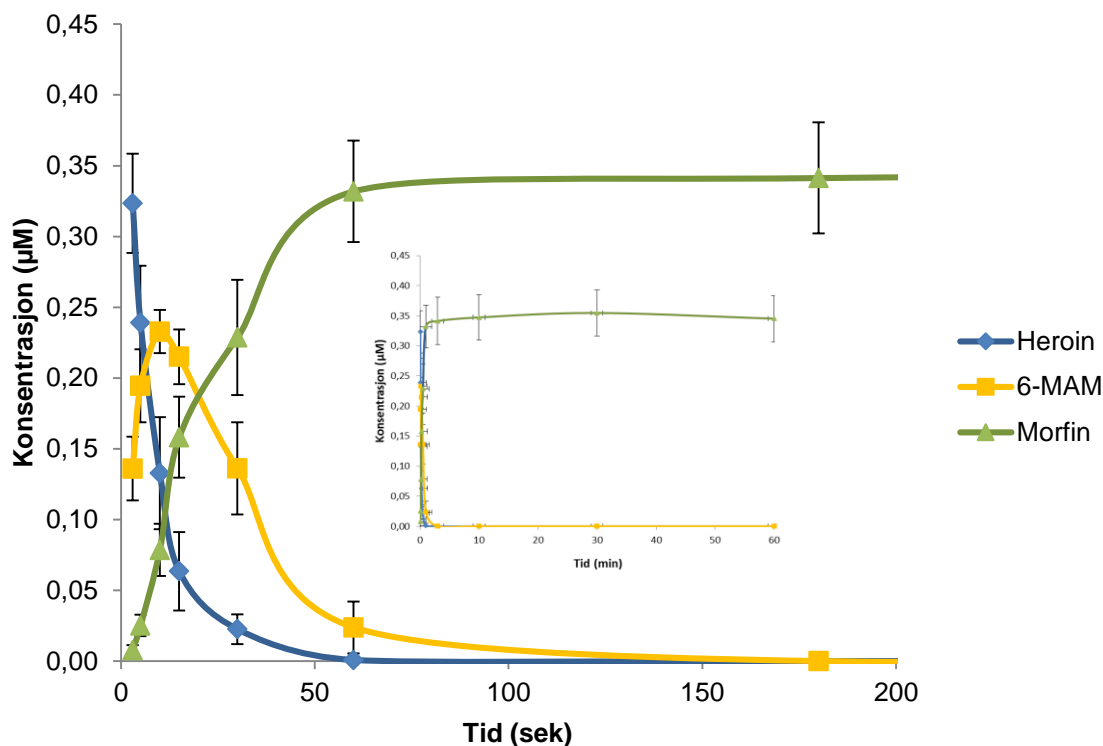
### 3.1 Heroinmetabolisme i humane leverpreparater

Esteraseaktivitet og tidsforløp for heroinmetabolisme ble studert i homogenisert humant levervev og humane levermikrosomer.

#### 3.1.1 Heroinmetabolisme i humant leverhomogenat

Heroinmetabolisme i leverhomogenat ble målt over tid, og er presentert i Figur 3.1. Heroin og metabolitter ble kvantifisert over en periode på 60 minutter.

Etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  heroin sank heroinkonsentrasjonen i leverhomogenatet raskt, parallelt med raskt økende 6-MAM-konsentrasjon. Heroin hadde en  $T_{1/2}$  på 5 sekunder (se Tabell 3.1), og var fullstendig omdannet etter 60 sekunder. Etter 12 sekunder hadde 6-MAM nådd  $C_{\text{max}}$  på 0,26  $\mu\text{M}$ , før konsentrasjonen begynte å avta.  $T_{1/2}$  til 6-MAM ble kalkulert til 14 sekunder. 6-MAM-konsentrasjonen var under laveste deteksjonsnivå (LOD) etter ca 150 sek. Morfinkonsentrasjonen steg til stabil  $C_{\text{max}}$  var nådd, rundt 0,33  $\mu\text{M}$ , og forble på dette nivået frem til siste målte tidspunkt (60 minutter). M3G og M6G ble ikke påvist i prøvene. Kinetiske parametere for heroinmetabolisme i humant leverhomogenat er presentert i Tabell 3.1.



**Figur 3.1:** Konsentrasjonskurver for heroin, 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat som funksjon av tid etter eksponering for 0,5 µM heroin. Tidspunkt for målinger er indikert med geometriske markører. Alle verdier er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 5.

**Tabell 3.1:** Kinetiske parametere for omdannelse av heroin til 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat. Alle verdier er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 5.

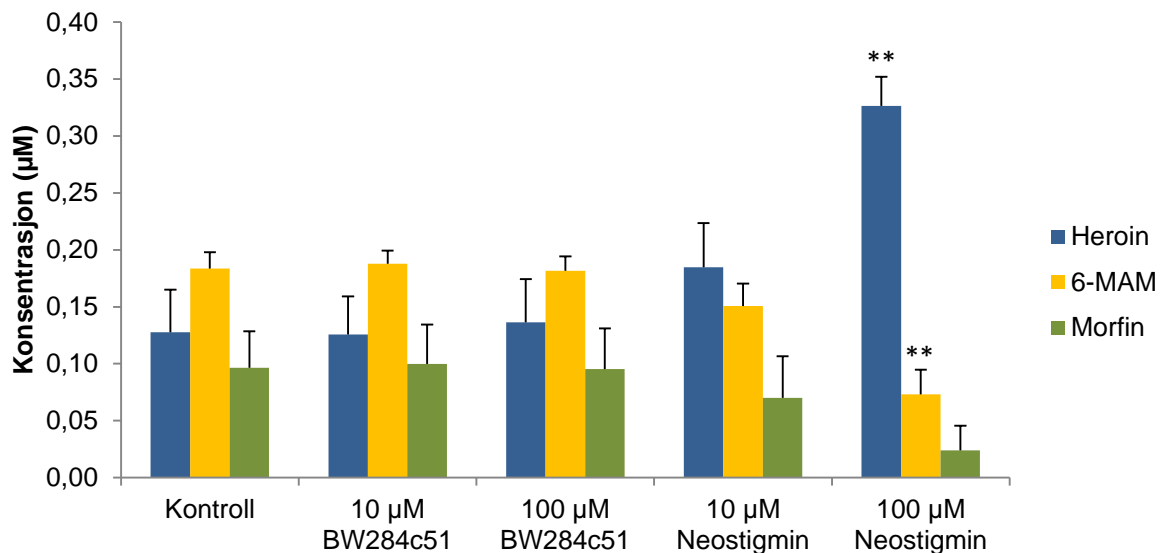
	<b>T<sub>1/2</sub> ± SEM</b>	<b>C<sub>max</sub> ± SEM</b>	<b>T<sub>max</sub> ± SEM</b>
<b>Heroin</b>	5,21 ± 1,07 sek	-	0 sek
<b>6-MAM</b>	13,88 ± 2,85 sek	0,26 ± 0,02 µM	12,24 ± 3,12 sek
<b>Morfin</b>	-	0,33 ± 0,04 µM	-

### 3.1.2 Inhibering av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat

Effekten av esterasehemmere på heroinmetabolisme ble testet *in vitro* i humant leverhomogenat. Signifikant effekt indikerer inhibering av esteraser involvert i omdannelse av heroin. Fordi hemmerene ble løst i ulike løsemidler er det inkludert ulike kontroller i figurene («kontroll», «vann» og «etanol», se kap. 2.4.2).

## AChE-inhibitorer

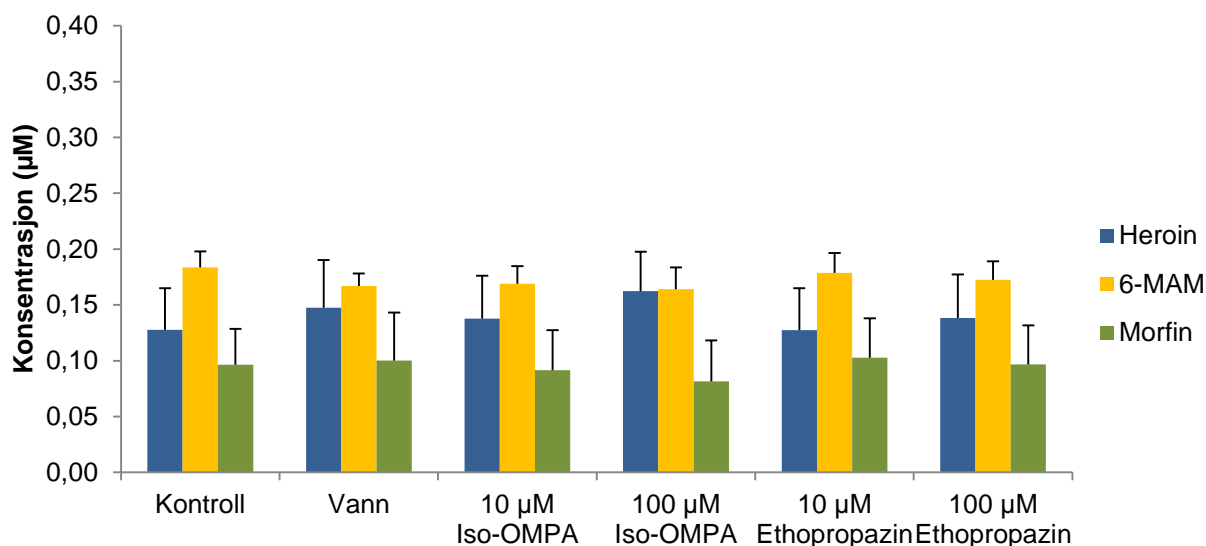
Effekten av AChE-inhibitorerne BW284c51 og Neostigmin på heroinmetabolisme i humant leverhomogenat er presentert i Figur 3.2. I kontrollen ble 70 % av tilsatt heroin (sluttkonsentrasjon 0,5  $\mu\text{M}$ ) omdannet i løpet av eksponeringsperioden på 10 sekunder. Ved eksponering for 100  $\mu\text{M}$  Neostigmin ble kun 22 % av tilsatt heroin omdannet. Dette tilsvarer en signifikant reduksjon i heroinmetabolisme på 69 % (ANOVA  $p=0,004$ ; Dunnett  $p=0,003$ ). Tilsetning av 100  $\mu\text{M}$  Neostigmin forårsaket også at det ble dannet 60 % mindre 6-MAM sammenliknet med kontroll (ANOVA  $p=0,004$ ; Dunnett  $p=0,003$ ). Tilsetning av BW284c51 og 10  $\mu\text{M}$  Neostigmin hadde ingen signifikant effekt på heroinmetabolisme i humant leverhomogenat.



**Figur 3.2:** Konsentrasjoner av heroin, 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  heroin ved tilstedeværelse av 10 og 100  $\mu\text{M}$  AChE-hemmere. Inkubasjonstid var 10 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll er indikert med stjerner (\* $p\leq 0,05$ ; \*\* $p\leq 0,01$ ; \*\*\* $p\leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .

## BChE-inhibitorer

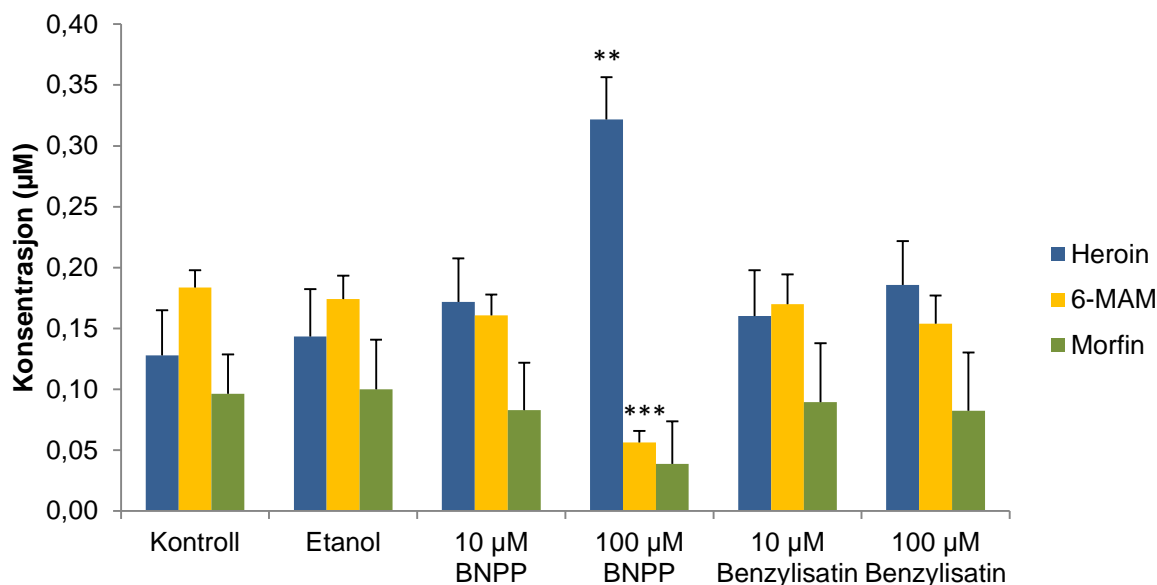
Effekten av BChE-inhibitorerne Iso-OMPA og Ethopropazin på heroinmetabolisme i humant leverhomogenat er fremstilt i Figur 3.3. Tilsetning av Iso-OMPA og Ethopropazin hadde ingen signifikant effekt på heroinmetabolisme i humant leverhomogenat.



**Figur 3.3:** Konsentrasjoner av heroin, 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat etter eksponering for 0,5 μM heroin ved tilstedeværelse av 10 og 100 μM BChE-hemmere. Inkubasjonstid var 10 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll (vann er løsningskontroll til Ethopropazin) er indikert med stjerner (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .

## CE-inhibitorer

Effekten av CE-inhibitorerne BNPP og Benzyllisatin på heroinmetabolisme er presentert i Figur 3.4. I kontrollen ble 70 % av tilsatt heroin (sluttkonsentrasjon 0,5 μM) omdannet i løpet av 10 sekunder. Ved eksponering for 100 μM BNPP ble kun 23 % av tilsatt heroin omdannet til metabolitter. Det tilsvarer en signifikant reduksjon i heroinmetabolisme på 67 % (ANOVA  $p = 0,006$ ; Dunnett  $p = 0,005$ ). Tilstedeværelse av 100 μM BNPP forårsaket også at det ble dannet 69 % mindre 6-MAM sammenliknet med kontroll (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Benzyllisatin og 10 μM BNPP hadde ingen signifikant effekt på heroinmetabolisme i humant leverhomogenat.

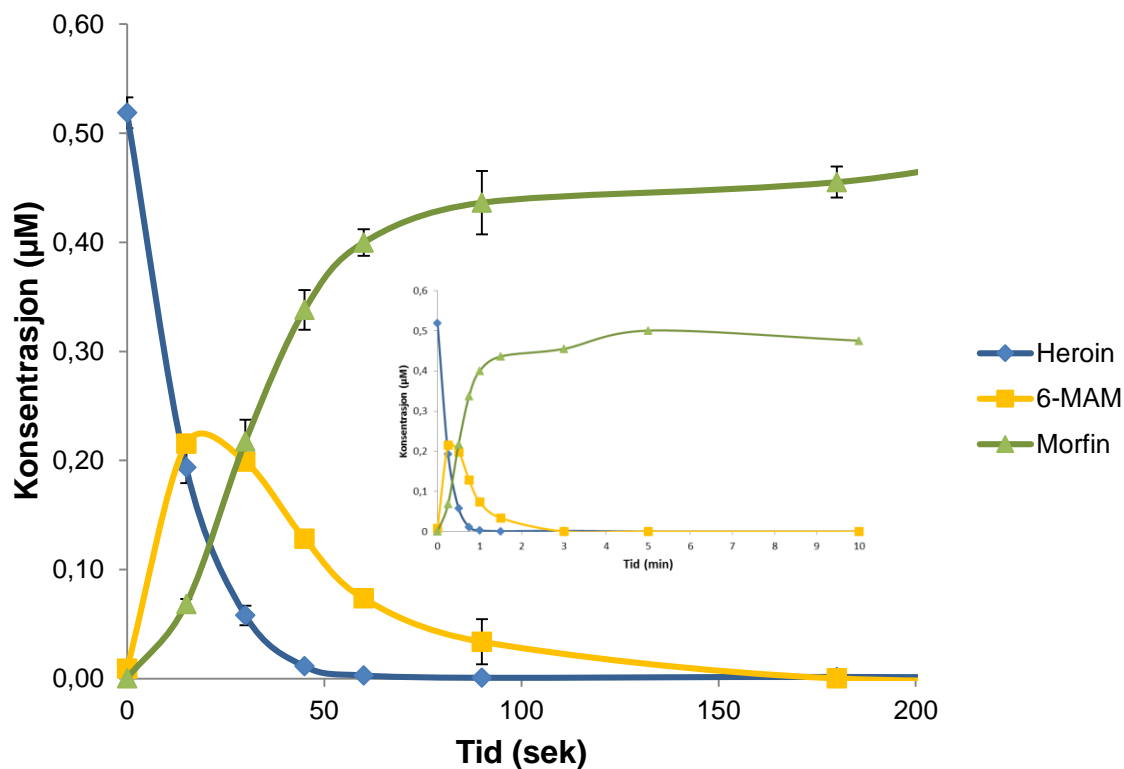


**Figur 3.4:** Konsentrasjoner av heroin, 6-MAM, og morfin i humant leverhomogenat etter eksponering for 0,5 µM heroin ved tilstedeværelse av 10 og 100 µM CE-hemmere. Inkubasjonstid var 10 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll (etanol er løsningskontroll til Benzylisatin) er indikert med stjerner (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 4 - 5$ .

### 3.1.3 Heroinmetabolisme i humane levermikrosomer

Metabolisme av heroin i humane levermikrosomer ble målt over tid, og er presentert i Figur 3.5. Heroin og metabolitter ble kvantifisert over en periode på 10 minutter.

Etter eksponering for 0,5 µM heroin sank heroinkonsentrasjonen raskt, samtidig som 6-MAM-konsentrasjonen økte. Heroin hadde en  $T_{1/2}$  på 10 sekunder (se Tabell 3.2), og var fullstendig omdannet etter 60 sekunder. 6-MAM-konsentrasjonen nådde  $C_{max}$  (0,22 µM) etter 18 sekunder, og begynte deretter å avta.  $T_{1/2}$  ble kalkulert til å være 18 sekunder for 6-MAM. Etter tre minutter var 6-MAM-konsentrasjonen under LOD. Morfinkonsentrasjonen steg til  $C_{max}$  (0,5 µM) var nådd, og forble stabil frem til siste målte tidspunkt (10 min). Normorfin, M6G og M3G ble ikke påvist i prøvene. Kinetiske parametere for heroinmetabolisme i humane levermikrosomer er presentert i Tabell 3.2.



**Figur 3.5:** Konsentrasjonskurver for heroin, 6-MAM og morfin i humane levermikrosomer som funksjon av tid etter eksponering for 0,5 µM heroin. Tidspunkt for målinger er indikert med geometriske markører. Alle verdier er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n = 5.

**Tabell 1.2:** Kinetiske parametere for omdannelse av heroin til 6-MAM og morfin i humane levermikrosomer. Alle verdier er presentert som gjennomsnitt ± SEM, n=5.

	<b>T<sub>1/2</sub> ± SEM</b>	<b>C<sub>max</sub> ± SEM</b>	<b>T<sub>max</sub> ± SEM</b>
<b>Heroin</b>	9,95 ± 0,24 sek	-	0 sek
<b>6-MAM</b>	17,66 ± 4,83 sek	0,22 ± 0,00 µM	17,54 ± 1,03 sek
<b>Morfin</b>	-	0,50 ± 0,01 µM	-

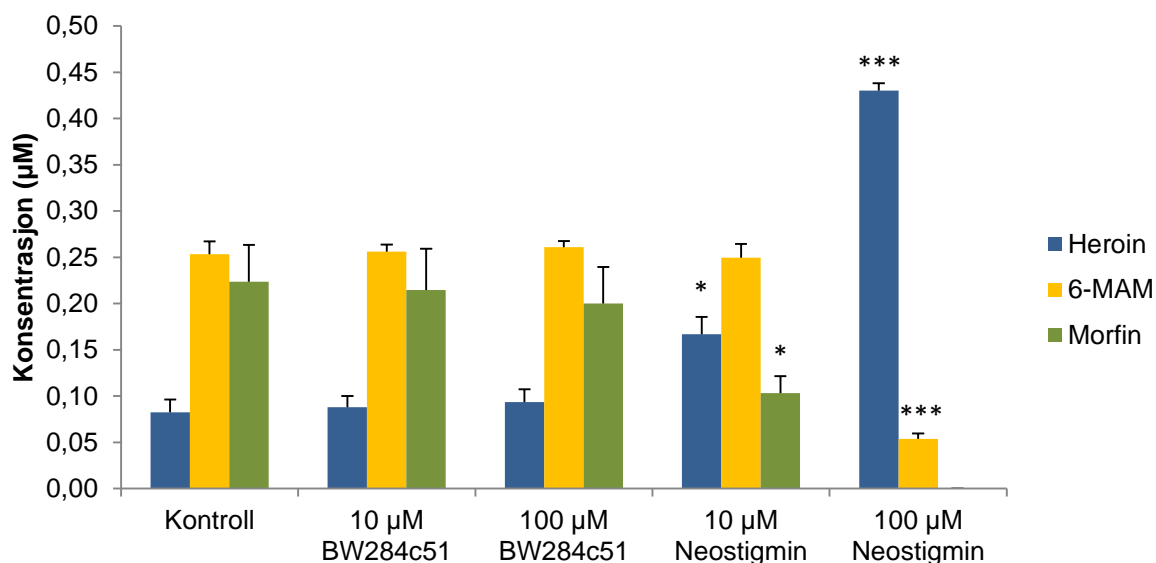
### 3.1.4 Inhibering av heroinmetabolisme i humane levermikrosomer

Effekten av esterasehemmere på heroinmetabolisme ble testet *in vitro* i humane levermikrosomer. Signifikant effekt indikerer inhibering av esteraser involvert i omdannelse av heroin. Fordi hemmerene ble løst i ulike løsemidler er det inkludert ulike kontroller i figurene («kontroll», «vann» og «etanol», se kap. 2.4.2).



## AChE-inhibitorer

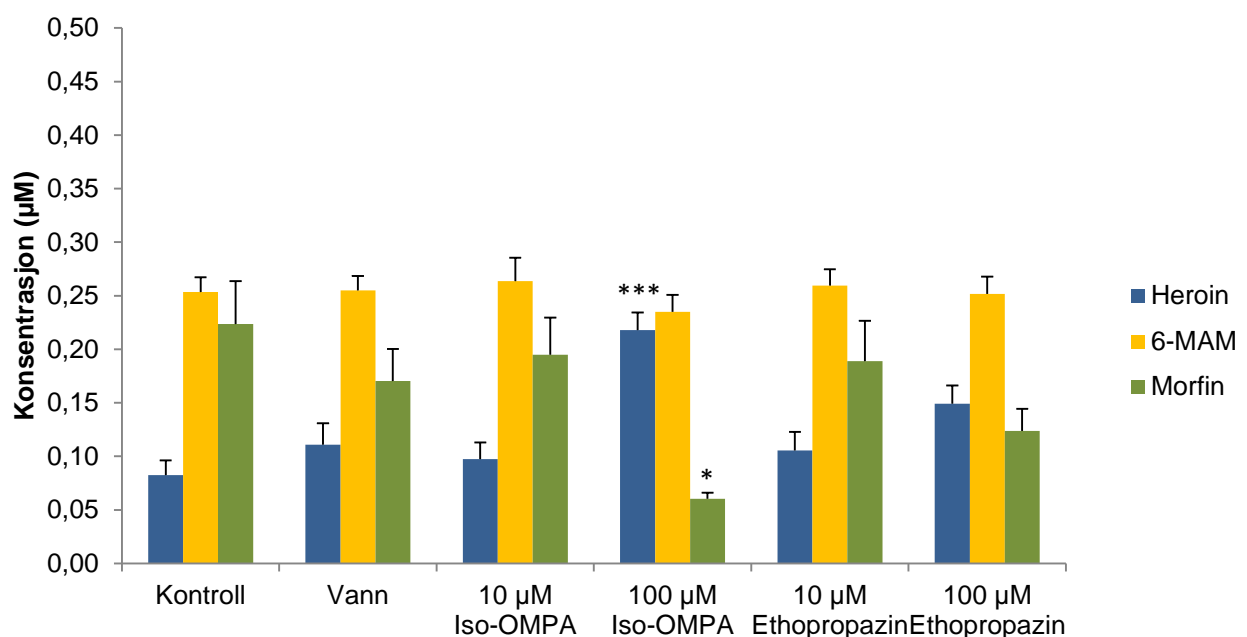
Effekten av AChE-inhibitorerne Neostigmin og BW284c51 er fremstilt i Figur 3.6. I kontrollen ble 83 % av tilsatt heroin (sluttkonsentrasjon 0,5  $\mu\text{M}$ ) omdannet i løpet av eksponeringsperioden på 20 sekunder. Ved tilstedeværelse av 100  $\mu\text{M}$  Neostigmin ble kun 12 % av tilsatt heroin omdannet. Dette tilsvarer en signifikant reduksjon i heroinmetabolisme på 86 % (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Tilstedeværelse av 100  $\mu\text{M}$  Neostigmin forårsaket også 79 % reduksjon i dannelsen av 6-MAM sammenliknet med kontrollen (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Morfin ble ikke påvist i prøver tilsatt 100  $\mu\text{M}$  Neostigmin. Tilsetning av 10  $\mu\text{M}$  Neostigmin hadde også signifikant effekt på heroinmetabolisme, da 66 % av tilsatt heroin ble omdannet (ANOVA  $p = 0,002$ ; Dunnett  $p = 0,011$ ). Det tilsvarer 20 % reduksjon i heroinmetabolisme sammenliknet med kontroll. Tilstedeværelse av 10  $\mu\text{M}$  Neostigmin forårsaket også 54 % reduksjon i dannelsen av morfin sammenliknet med kontroll (ANOVA  $p = 0,002$ ; Dunnett  $p = 0,026$ ). Tilsetning av BW284c51 hadde ingen signifikant effekt på heroinmetabolisme i humane levermikrosomer.



**Figur 3.6:** Konsentrasjoner av heroin, 6-MAM og morfin i humane levermikrosomer etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  heroin ved tilstedeværelse av 10 og 100  $\mu\text{M}$  AChE-hemmere. Inkubasjonstid var 20 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll er indikert med stjerner (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

## BChE-inhibitorer

Effekten av BChE-inhibitorerne Iso-OMPA og Ethopropazin er presentert i Figur 3.7. I kontrollen ble 83 % av tilsatt heroin (sluttkonsentrasjon 0,5  $\mu\text{M}$ ) omdannet i løpet av 20 sekunder. Ved tilsetning av 100  $\mu\text{M}$  Iso-OMPA ble kun 55 % av tilsatt heroin omdannet. Det tilsvarer en signifikant reduksjon i heroinmetabolisme på 34 % (ANOVA  $p=0,001$ ; Dunnett  $p=0,001$ ). I tillegg forårsaket tilstedeværelse av 100  $\mu\text{M}$  Iso-OMPA 73 % reduksjon i dannelsen av morfin sammenliknet med kontroll (ANOVA  $p=0,02$ ; Dunnett  $p=0,017$ ). Tilsetning av Ethopropazin og 10  $\mu\text{M}$  Iso-OMPA hadde ingen signifikant effekt på heroinmetabolisme i humane levermikrosomer.

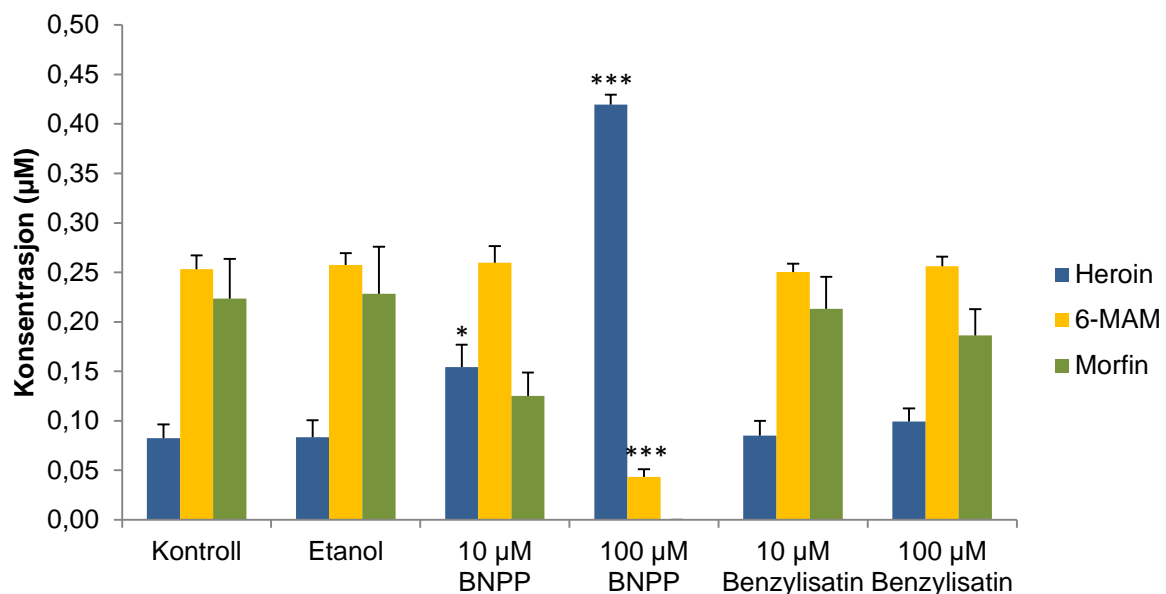


**Figur 2.7:** Konsentrasjoner av heroin, 6-MAM og morfin i humane levermikrosomer etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  heroin ved tilstedeværelse av 10 og 100  $\mu\text{M}$  BChE-hemmere. Inkubasjonstid var 20 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll (vann er løsningskontroll til Ethopropazin) er indikert med stjerner (\* $p\leq 0,05$ ; \*\* $p\leq 0,01$ ; \*\*\* $p\leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

## CE-inhibitorer

Effekten av CE-inhibitorerne BNPP og Benzylisatin på heroinmetabolisme i humane levermikrosomer er presentert i Figur 3.8. I kontrollen ble 83 % av tilsatt heroin (sluttkonsentrasjon 0,5  $\mu\text{M}$ ) omdannet i løpet av 20 sekunder. Ved tilstedeværelse av 100  $\mu\text{M}$  BNPP ble kun 14 % av tilsatt heroin omdannet. Det tilsvarer en signifikant reduksjon i heroinmetabolisme på 83 % (ANOVA  $p<0,001$ ; Dunnett  $p<0,001$ ). Tilsetning av 100  $\mu\text{M}$  BNPP forårsaket også 83 % reduksjon i dannelsen av 6-MAM sammenliknet med kontroll

(ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Morfin ble ikke påvist ved tilstedeværelse av 100  $\mu\text{M}$  BNPP. Tilsetning av 10  $\mu\text{M}$  BNPP hadde også signifikant effekt på heroinmetabolisme, da 68 % av tilsatt heroin ble omdannet (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p = 0,036$ ). Det tilsvarer 18 % reduksjon i heroinmetabolisme sammenliknet med kontroll. Benzyllisatin hadde ingen signifikant effekt på heroinmetabolisme i humane levermikrosomer.



**Figur 3.8:** Konsentrasjoner av heroin, 6-MAM og morfin i humane levermikrosomer etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  heroin ved tilstedeværelse av 10 og 100  $\mu\text{M}$  CE-hemmere. Inkubasjonstid var 20 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll (etanol er løsningskontroll til Benzyllisatin) er indikert med stjerner (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 3$ .

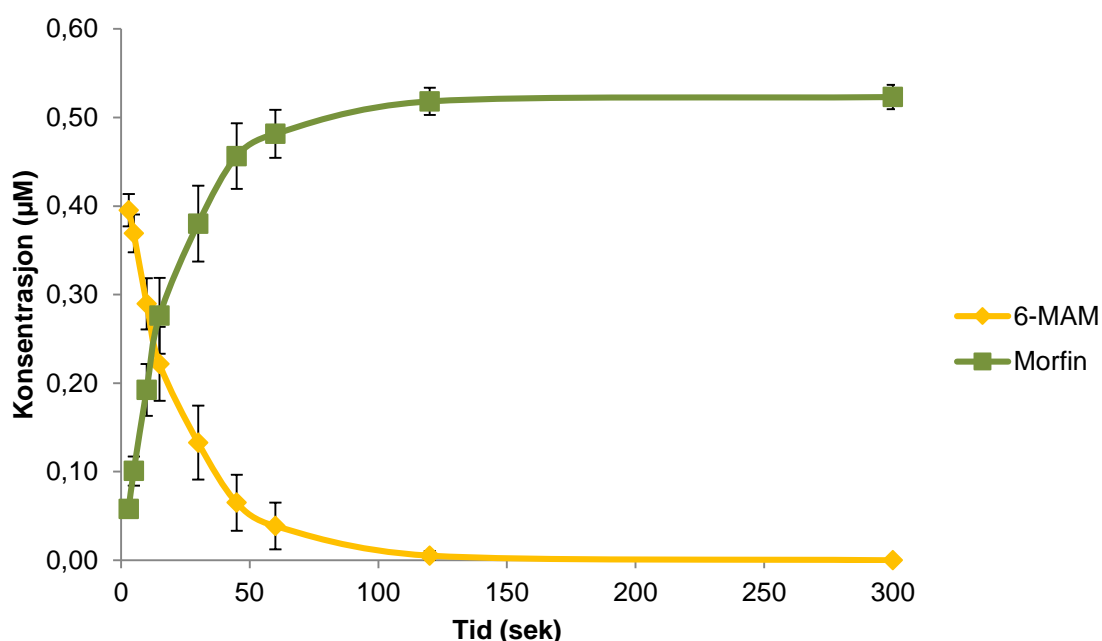
## 3.2 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat

Esteraseaktivitet og tidsforløp for 6-MAM-metabolisme ble studert i homogenisert humant levervev.

### 3.2.1 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat

6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat ble målt over tid, og er presentert i Figur 3.9. 6-MAM og morfin ble kvantifisert over en periode på fem minutter, basert på resultatene fra heroinmetabolisme i humant leverhomogenat (se kap. 3.1.1) som viste at 6-MAM var fullstendig omdannet og at morfin hadde nådd stabil  $C_{\text{max}}$  i løpet av dette tidsintervallet.

Etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  6-MAM sank 6-MAM-konsentrasjonen raskt, parallelt med økende morfinkonsentrasjon. 6-MAM hadde en  $T_{1/2}$  på 17 sekunder (se Tabell 3.3), og var fullstendig omdannet etter to minutter. Morfinkonsentrasjonen økte til stabil  $C_{\text{max}}$  var nådd, rundt 0,53  $\mu\text{M}$ , og forble på dette nivået frem til siste målte tidspunkt (5 min).  $T_{1/2}$  til 6-MAM som administrert substans og som sekundær metabolitt av heroin i humant leverhomogenat (se kap. 3.1.1) ble statistisk sammenliknet og funnet å ikke være signifikant forskjellig (T-test  $p > 0,05$ ). Kinetiske parametere for 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat er presentert i Tabell 3.3.



**Figur 3.9:** Konsentrasjonskurver for 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat som funksjon av tid (sek) etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  6-MAM. Tidspunkt for målinger er indikert med geometriske markører. Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .

**Tabell 3.3:** Kinetiske parametere for omdannelse av 6-MAM til morfin i humant leverhomogenat Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .

	$T_{1/2} \pm \text{SEM}$	$C_{\text{max}} \pm \text{SEM}$	$T_{\text{max}} \pm \text{SEM}$
<b>6-MAM</b>	$16,67 \pm 4,43 \text{ sek}$	-	0 sek
<b>Morfin</b>	-	$0,53^7 \pm 0,015 \mu\text{M}$	-

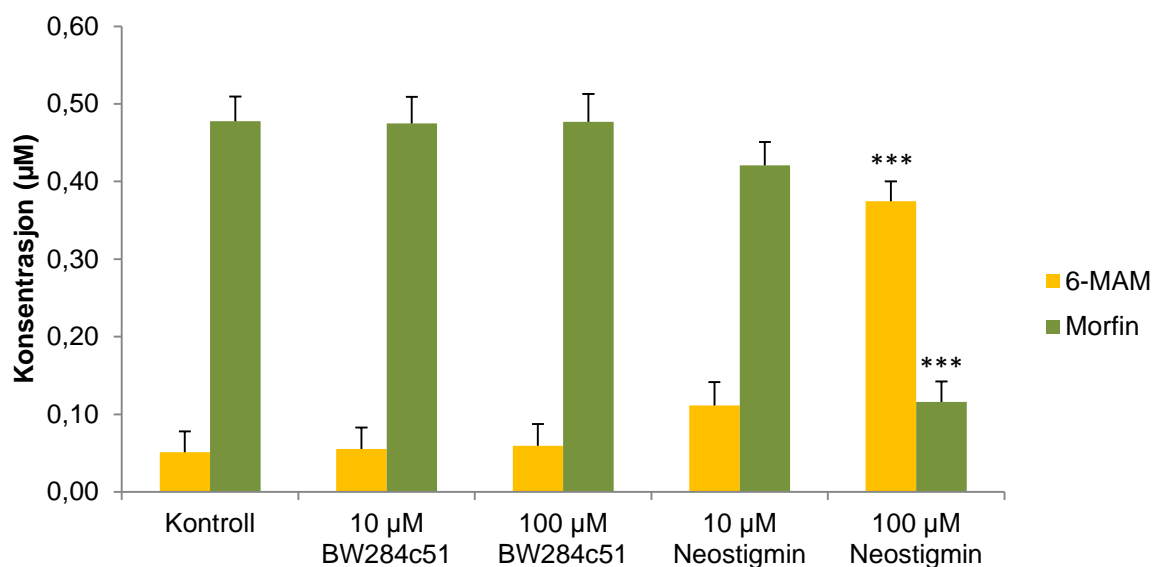
<sup>7</sup> Verdi er regnet ut manuelt fra målte verdier, ikke ved bruk av Kinetica.

### 3.2.2 Inhibering av 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat

Effekten av esterasehemmere på 6-MAM-metabolisme ble testet *in vitro* i homogenisert humant levervev. Signifikant effekt indikerer inhibering av esteraser involvert i omdannelse av 6-MAM. Fordi hemmerene ble løst i ulike løsemidler er det inkludert ulike kontroller i figurene («kontroll», «vann» og «etanol», se kap. 2.4.2).

#### AChE-inhibitorer

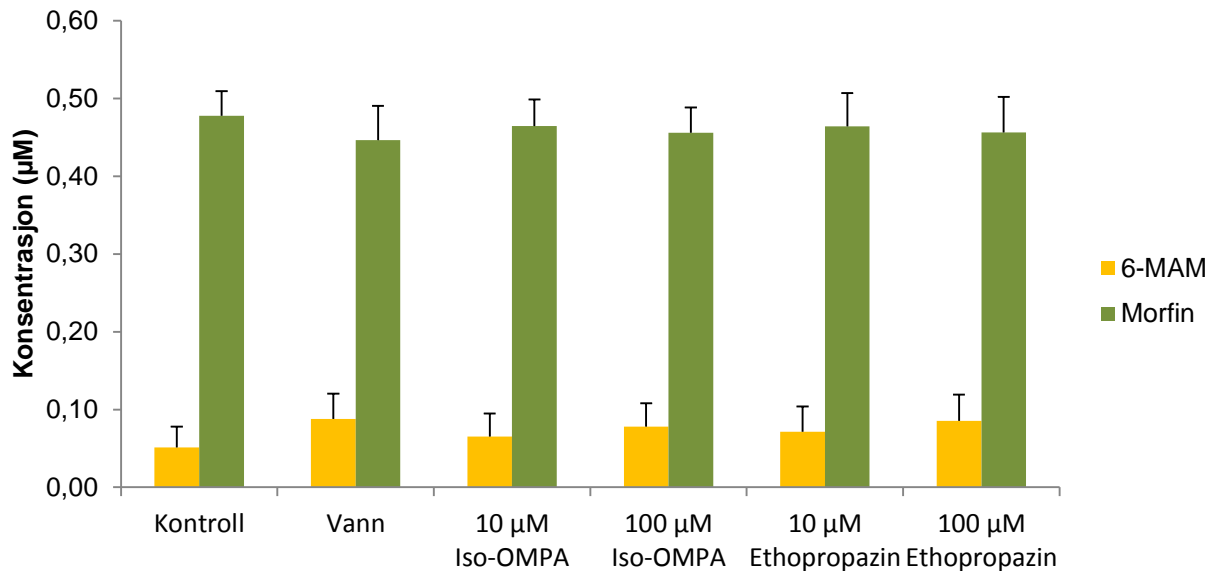
Effekten av AChE-inhibitorerne BW284c51 og Neostigmin på 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat er presentert i Figur 3.10. I kontrollen ble 89 % av tilsatt 6-MAM (sluttkonsentrasjon 0,5  $\mu\text{M}$ ) omdannet i løpet av eksponeringsperioden på 45 sekunder. Ved tilstedeværelse av 100  $\mu\text{M}$  Neostigmin ble kun 20 % av tilsatt 6-MAM omdannet. Det tilsvarer en signifikant reduksjon i 6-MAM-metabolisme på 78 % (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Tilsetning av 100  $\mu\text{M}$  Neostigmin forårsaket også 76 % reduksjon i dannelsen av morfin sammenliknet med kontroll (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Tilsetning av BW284c51 og 10  $\mu\text{M}$  Neostigmin hadde ingen signifikant effekt på 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat.



**Figur 3.10:** Konsentrasjoner av 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat etter eksponering for 0,5  $\mu\text{M}$  6-MAM ved tilstedeværelse av 10 og 100  $\mu\text{M}$  AChE-hemmere. Inkubasjonstid var 45 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll er indikert med stjerner (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .

## BChE-inhibitorer

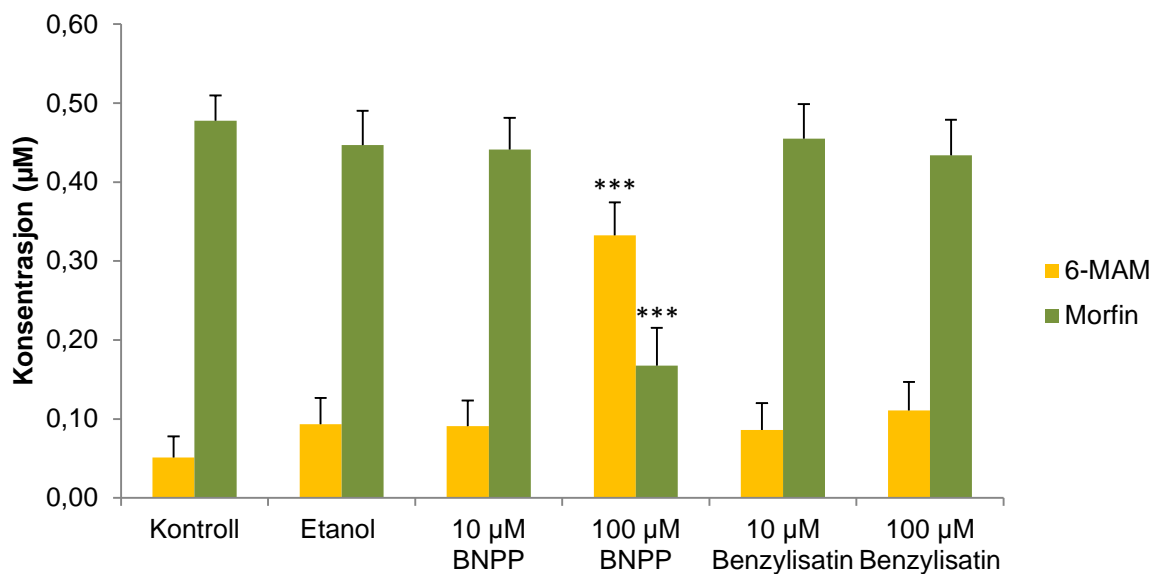
Effekten av BChE-inhibitorene Iso-OMPA og Ethopropazin på 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat er presentert i Figur 3.11. Tilsetning av Iso-OMPA og Ethopropazin hadde ingen signifikant effekt på 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat.



**Figur 3.11:** Konsentrasjoner av 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat etter eksponering for 0,5 μM 6-MAM ved tilstedeværelse av 10 og 100 μM BChE-hemmere. Inkubasjonstid var 45 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll (vann er løsningskontroll til Ethopropazin) er indikert med stjerner (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .

## CE-inhibitorer

Effekten av CE-inhibitorene BNPP og Benzyllisatin på 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat er presentert i Figur 3.12. I kontrollen ble 89 % av tilsatt 6-MAM (sluttkonsentrasjon 0,5 μM) omdannet i løpet av 45 sekunder. Ved tilstedeværelse av 100 μM BNPP ble kun 29 % av tilsatt 6-MAM omdannet. Det tilsvarer en signifikant reduksjon i 6-MAM-metabolisme på 67 % (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Tilsetning av 100 μM BNPP forårsaket også 65 % reduksjon i dannelsen av morfin sammenliknet med kontroll (ANOVA  $p < 0,001$ ; Dunnett  $p < 0,001$ ). Benzyllisatin og 10 μM BNPP hadde ingen signifikant effekt på 6-MAM-metabolisme i humant leverhomogenat.



**Figur 3.12:** Konsentrasjoner av 6-MAM og morfin i humant leverhomogenat etter eksponering for 0,5 µM 6-MAM ved tilstedeværelse av 10 og 100 µM CE-hemmere. Inkubasjonstid var 45 sekunder. Verdier signifikant forskjellige fra kontroll (etanol er løsningskontroll til Benzylisatin) er indikert med stjerner (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ). Alle verdier er presentert som gjennomsnitt  $\pm$  SEM,  $n = 5$ .

### 3.3 Glukuronidering

Kofaktoren UDPGA ble tilsatt i humant leverhomogenat og humane levermikrosomer for omdannelse av morfin til M3G og M6G. M3G og M6G ble ikke påvist i humant leverhomogenat eller humane levermikrosomer og studiene ble derfor avsluttet. Resultatene antyder at forventet glukuronideringsreaksjon katalysert av UDP-GT ikke har forekommet i prøvene.

### 3.4 Interindividuelle forskjeller i heroinmetabolisme

Levervev donert av fem pasienter ble brukt i studie av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat (se kap. 3.1.1). For hver av pasientene ble halveringstid for heroin og avhengige ratekonstanter ( $K_{6MAM}$  og  $K_{el}$ ) kalkulert.  $K_{6MAM}$  tilsvarer omdannelsesrate fra heroin til 6-MAM og  $K_{el}$  tilsvarer elimineringsraten til heroin i leverhomogenat. Individuelle kinetiske parametere tydeliggjør forskjeller i biotransformasjonen av heroin mellom pasientene, se Tabell 3.4.

**Tabell 3.4:** Kinetiske parametere for heroinmetabolisme i humant leverhomogenat kalkulert for hver enkelt leverdonor.  $T_{1/2}$  er halveringstiden til heroin,  $K_{6MAM}$  er omdannelsesrate fra heroin til 6-MAM og  $K_{el}$  er elimineringsraten til heroin.

	$T_{1/2}$ Heroin (sek)	$K_{6MAM}$ ( $\mu M \cdot$ sek <sup>-1</sup> )	$K_{el}$ ( $\mu M \cdot$ sek <sup>-1</sup> )
<b>Pasient 1</b>	3,21	0,18	0,22
<b>Pasient 2</b>	8,45	0,07	0,08
<b>Pasient 3</b>	3,31	0,18	0,21
<b>Pasient 4</b>	7,02	0,10	0,10
<b>Pasient 5</b>	4,06	0,18	0,17

Pasienter som ser ut til å ha svært rask omdannelse av heroin i leveren er markert med rosa, mens pasienter med mindre rask omdannelse av heroin i leveren er markert med blå farge i Tabell 3.4. Selv om de kinetiske parametere indikerer en tendens til at individene kan inndeles i to grupper er antallet pasienter ( $n = 5$ ) utilstrekkelig for å kunne påstå at en slik gruppering eksisterer.



## 4 Diskusjon

*In vivo* studier av heroinmetabolisme i mennesker byr på etiske problemstillinger. Alternativt benyttes det derfor forsøksdyr som rotter og mus for studier av heroinmetabolisme. Resultater fra studier med forsøksdyr kan ikke ekstrapoleres direkte til menneske da det eksisterer artsforskjeller i esteraseaktivitet som påvirker metabolisme og distribusjon av heroin. I denne studien ble det brukt humant levermateriale for *in vitro* studier av heroinmetabolisme, dermed unngås problemstillinger relatert til artsforskjeller. Leveren er det viktigste organet for biotransformasjon av de fleste substanser, derfor ble leverpreparater benyttet som studiemateriale i denne oppgaven. Kartlegging av *in vitro* human hepatisk heroinmetabolisme og involverte esteraser kan bidra til å øke kunnskapen om omdannelse av heroin i menneske. Detaljert kunnskap om human heroinmetabolisme kan benyttes i utvikling av nye behandlingsstrategier for heroinavhengighet og –overdoser. Økt viten om human heroinmetabolisme vil videre kunne brukes til å vurdere i hvilken grad studier av heroinmetabolisme i forsøksdyr er overførbare til menneske.

Biotransformasjon av eksogene forbindelser i intakt human lever er svært komplisert og derfor utfordrende å studere. Ved å homogenisere leverbiopsier forenkles studiesystemet og muliggjør *in vitro* studier av human hepatisk biotransformasjon, på bekostning av at kompleksiteten av organet reduseres sammenliknet med situasjonen *in vivo*. På tross av at homogenisert levervev trolig har høy *in vivo*-relevans for studier av human hepatisk biotransformasjon (Brandon et al. 2003), er ikke resultater fra studier med leverhomogenat direkte overførbare til *in vivo* biotransformasjon i human lever. Det er derfor essensielt å tolke alle resultater fra studier med humant leverhomogenat i lys av forenklingen.

### 4.1 Heroinmetabolisme i humane leverfraksjoner

Halveringstiden til heroin ble beregnet til å være 5 sekunder i homogenisert humant levervev. Den korte halveringstiden indikerer at heroin metaboliseres svært raskt i humant leverhomogenat. Heroinmetabolisme ble også studert i HLM, hvor  $T_{1/2}$  til heroin ble funnet å være kun 10 sekunder. 6-MAM ble noe langsommere omdannet til morfin da  $T_{1/2}$  til 6-MAM ble beregnet til å være 14 sekunder i leverhomogenat, og 18 sekunder i HLM. *In vitro* studier av heroinmetabolisme i humant blod utført på avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling (upubliserte data) har funnet en  $T_{1/2}$  til heroin på 23 minutter (se vedlegg

kap. 6.2). I en oversiktsartikkel sammenliknet Rook et al. (2006b) *in vivo*  $T_{1/2}$  til heroin fra flere studier, og kom frem til at halveringstiden var omtrent tre minutter. Disse to studiene indikerte en betydelig lenger halveringstid for heroin sammenliknet med humant leverhomogenat.

Salmon et al. (1999) har antydnet at enkelte enzymer kun omdanner 6-MAM når heroin er det administrerte substratet. I denne oppgaven ble kinetiske parametere kalkulert for 6-MAM både som administrert substans og som sekundær metabolitt av heroin. Statistisk sammenlikning mellom  $T_{1/2}$  til 6-MAM som administrert substans og som metabolitt i humant leverhomogenat viste ingen signifikant forskjell i  $T_{1/2}$  i de to situasjonene (T-test  $p > 0,05$ ) (se kap. 3.2.1). Vår studie støtter dermed ikke hypotesen om at enzymene preferer 6-MAM som metabolitt av heroin, men indikerer at de samme enzymene er involvert i omdannelse av 6-MAM uavhengig av om heroin eller 6-MAM tilsettes.

For å kartlegge videre omdannelse av heroin ble kofaktoren UDPGA tilsatt i humant leverhomogenat og i HML. Metabolittene M3G og M6G ble ikke påvist og studiene ble derfor avsluttet. Årsaken til manglende dannelse av M3G og M6G i studiene med tilsatt UDPGA kan skyldes at enzymet ansvarlig for glukuronidering av morfin til M3G og M6G, UDP-GT, også krever den eksogene kofaktoren alameticin for katalytisk aktivitet (Brandon et al. 2003).

## 4.2 Esteraser involvert i hepatisk heroinmetabolisme

Esteraseinhibitorer ble tilsatt i humant leverhomogenat og HLM for å forsøke å påvise hvilke esteraser som var aktive under metabolismen av heroin. Effekten av inhibitorene uttrykkes ved at nedbrytningen av heroin hemmes. Effekt ble påvist av Neostigmin og BNPP, som inhiberer henholdsvis AChE og CE.

Resultatene indikerer at AChE er en viktig esterase involvert i human hepatisk heroinmetabolisme. Til vår kjennskap finnes det ikke tidligere publiserte studier som indikerer tilstedeværelse av AChE i human lever, og deteksjon av AChE-involvering i heroinmetabolisme var derfor et uventet funn. For å utelukke feilkilder ble stam- og bruksløsninger av AChE-inhibitoren Neostigmin laget av ulike personer på ulike

forsøksdager. I tillegg ble rekkefølgen av inhibitorerne brukt i studien variert for å unngå følgefeil. Ingen feil i studieoppsettet ble funnet.

Levervevet benyttet i studien ble ikke perfundert før homogenisering, og inneholdt derfor blod. En mulig forklaring på påvist AChE-aktivitet i leverhomogenat kan derfor være at AChE-aktiviteten stammet fra blodet, fordi AChE er en kjent komponent i humant blod (Li et al. 2005). En alternativ forklaring kan være at Neostigmin ikke er spesifikk nok til at effekten som ble påvist nødvendigvis skyldes inhibering av AChE. Neostigmin er en potent inhibitor av AChE, men noen studier har vist at Neostigmin også kan inhibere BChE (Atack et al. 1989; Todrick 1954). AChE er mer sensitiv for hemming, og inhiberes derfor ved lavere Neostigmin-konsentrasjoner enn BChE (Yang et al. 1996). Hvorvidt spesifisiteten til Neostigmin endres med konsentrasjon og om dette kan være årsaken til observert AChE-aktivitet i human lever krever videre studier. Dette er et generelt problem ved bruk av esterasehemmere, se introduksjonen kap. 1.4.

På grunnlag av at nivået av CE (Berry et al. 2009; Hauan 2014; Taketani et al. 2007) og BChE (Berry et al. 2009) i human lever og rottelever er beskrevet å være høyt, var det forventet å påvise CE og BChE som esteraser involvert i human hepatisk heroinmetabolisme. CE-inhibitoren BNPP hadde signifikant effekt på heroinmetabolisme, men effekt av BChE-inhibitorerne Iso-OMPA og Ethopropazin ble derimot ikke påvist i leverhomogenat. En mulig forklaring på at BChE ikke ble identifisert som aktiv esterase kan blant annet skyldes varierende inhibitorspesifisitet mellom arter (Andersen et al. 1977). Slik artsvariasjon i inhibitorspesifisitet for esteraser er også en mulig årsak til at AChE-inhibitoren BW284c51 ikke viste effekt, selv om aktivitet av AChE ble indikert av Neostigmin.

Denne oppgaven har studert bidraget fra AChE, BChE og CE til human hepatisk heroinmetabolisme, men vi kan ikke utelukke involvering av andre enzymer. For eksempel er albumin og paraoksonase enzymer med esteraseaktivitet som potensielt kan bidra til omdannelse av heroin. Paraoksonase har blitt identifisert i human lever, mens både paraoksonase og albumin er tilstede i humant blod (Klaassen et al. 2008; Li et al. 2005).

## **Er esteraser involvert i heroinmetabolisme tilstede i human levermikrosomfraksjon?**

AChE og CE ble identifisert som viktige esteraser involvert i heroinmetabolisme, både i studier med humant leverhomogenat og HLM. I HLM viste Neostigmin og BNPP inhibering av esteraser ved begge testkonsentrasjoner (10 og 100  $\mu\text{M}$ , se Figur 3.6 og 3.8), samt at effekt av BChE-inhibitoren Iso-OMPA ble påvist (100  $\mu\text{M}$ , se Figur 3.7).

Det faktum at AChE ble påvist som aktiv esterase i HLM, i tillegg til i leverhomogenat, bidrar til å underbygge antagelsen om at AChE deltar i human hepatisk heroinmetabolisme. HLM skal ikke inneholde blod, derfor kan vi trolig utelukke at AChE-aktivitet i humant leverhomogenat skyldtes tilstedeværelse av AChE i humant blod.

Iso-OMPA viste også effekt på omdannelse av heroin i HLM, noe som indikerer at BChE er involvert i human hepatisk heroinmetabolisme. Selv om Iso-OMPA ofte betraktes som en spesifikk BChE-inhibitor (Giacobini et al. 2002; Koelle et al. 1974; Li et al. 2000; Thomsen et al. 1991), har den også vist inhibering av CE (Chambers et al. 1991; Chanda et al. 1997; Grubič et al. 1988; Maxwell & Brecht 2001). Den påviste effekten av Iso-OMPA kan derfor skyldes inhibering av CE, og ikke BChE som først antatt.

Våre studier av heroinmetabolisme i leverhomogenat og HLM ga svært sammenfallende resultater: i løpet av sekunder ble heroin omdannet til 6-MAM, som langsommere ble brutt ned til morfin (se Figur 3.1, 3.5, og 3.9). Resultatene indikerer at AChE og CE er de viktigste esterasene ansvarlig for nedbrytning av heroin i human lever, da aktivitet av begge esterasene indirekte ble påvist både i leverhomogenat og HLM. HLM består av ER fra hepatocytter, dermed indikerer resultatene at viktige heroinmetaboliserende enzymer er lokalisert i ER. Kvantitativt bidrag fra esteraser lokalisert i ER til hepatisk heroinmetabolisme kan derimot ikke estimeres uten å gjøre forsøk med andre leverfraksjoner. For eksempel kan cytosol og S9-fraksjonen være interessante cellefraksjoner for videre studier av enzymaktivitet.

Som følge av at HLM er et konsentrert ekstrakt fra homogenisert levervev, må sammenlikninger av enzymaktivitet og farmakokinetikk mellom HLM og leverhomogenat gjøres med varsomhet. Konsentrasjonen av enzymer er kunstig høye i mikrosomer sammenliknet med leverhomogenat, samt at isolering av HLM innebærer eliminering av cellulære interaksjoner med for eksempel andre enzymer, kofaktorer og cellulære komponenter. Som beskrevet i introduksjonen (se kap 1.5) har HLM trolig redusert *in vivo*-

relevans sammenliknet med homogenisert levervev (Brandon et al. 2003), selv om homogenisering også involverer destruering av celle- og vevsstruktur. Årsaken til at vi likevel benyttet HLM for studier av heroinmetabolisme er at HLM også har mange fordeler som *in vitro*-modell. HLM er enklere å arbeide med, faren for smitte er mindre, samt at HLM er lettere å anskaffe og er mindre kompliserte sammenliknet med homogenisert levervev (Brandon et al. 2003). På grunn av at resultatene fra forsøkene med leverhomogenat og HLM viste såpass god overensstemmelse i heroinmetabolisme vil HLM kunne erstatte leverhomogenat i videre studier av human hepatisk heroinmetabolisme, dog forbehold må tas med hensyn til ekstrapolering.

### 4.3 Studier av heroinmetabolisme med humant materiale vs. rottevev

Tidligere studier av heroinmetabolisme har hovedsakelig blitt utført med forsøksdyr som rotter og mus. Farmakokinetiske og farmakodynamiske resultater fra studier med forsøksdyr kan ikke direkte relateres til menneske som følge av artsvariasjoner i metabolisme og distribusjon av heroin.

Resultatene fra studier av heroinmetabolisme i humant leverhomogenat og HLM antyder rask omdannelse av heroin. *In vitro*  $T_{1/2}$  til heroin i homogenat av perfundert rottelever ble funnet å være 33 sekunder (Hauan 2014, se kap 6.3), dvs ~7 x langsommere enn i humant leverhomogenat (T-test  $p < 0,001$ ) (se kap. 6.3). Omdannelse av 6-MAM fremstår også som betydelig langsommere i homogenat av rottelever da  $T_{1/2}$  for 6-MAM ble funnet å være > 8 minutter (se kap. 6.3), som tilsvarer 36 x langsommere sammenliknet med humant leverhomogenat. Våre studier antyder derfor at human lever metaboliserer heroin raskere enn rottelever. Ulik effektivitet av hepatisk heroinmetabolisme kan skyldes artsvariasjoner i esteraseaktivitet.

På tross av at våre resultater ikke indikerer involvering av BChE i human hepatisk heroinmetabolisme antyder Berry et al (2009) tilstedeværelse av BChE i human lever. Høyere BChE- og CE-aktivitet i human lever sammenliknet med rottelever (Berry et al. 2009; Taketani et al. 2007) kan være årsaken til at human lever fremstår som mer effektiv for heroinmetabolisme sammenliknet med rottelever. Studier med andre humane organer kreves for å kartlegge leverens kvantitative bidrag til *in vivo* human heroinmetabolisme.

Studier antyder at det også eksisterer store artsforskjeller i heroinmetabolisme mellom humant blod og rotteblod. *In vitro*  $T_{1/2}$  til heroin i humant blod er funnet å være mye lenger enn i rotteblod (Cohn et al. 1973; Oldendorf & Stoller 1989; Umans et al. 1982). Umans et al. (1982) fant en *in vitro*  $T_{1/2}$  til heroin på 23 sekunder i rotteblod, som tilsvarer 60 x raskere enn i humant blod (se kap. 6.2). Den betydelige artsforskjellen i hastigheten på heroinmetabolisme i blod mellom rotter og mennesker kan skyldes høyere plasma-esteraseaktivitet hos rotter sammenliknet med mennesker som følge av tilstedeværelse av CE i rotteblod (Bahar et al. 2012; Li et al. 2005).

Våre resultater underbygger ytterligere hypotesen om at det eksisterer store artsforskjeller i heroinmetabolisme mellom mennesker og forsøksdyr. På tross av forskjellige *in vitro* halveringstid i blod og leverhomogenat har *in vivo*-halveringstid til heroin i gnagere og mennesker vist seg å være bemerkelsesverdig lik, på ca 2,5 – 4 minutter (Boix et al. 2013; Gottås et al. 2013; Rook et al. 2006b; Way et al. 1960). Som følge av tilsvarende *in vivo* halveringstid for heroin hos rotter og mennesker er rotter verdifulle forsøksdyr i studier av heroinmetabolisme, hovedsakelig for *in vivo* studier. Våre studier indikerer at leveren har svært effektiv omdannelse av heroin sammenliknet med blod hos mennesker, da *in vitro*  $T_{1/2}$  til heroin i humant leverhomogenat er funnet å være 276 x raskere enn i humant blod (Welch's t-test  $p=0,002$ ) (se kap. 6.2). Studier utført på vårt laboratorium har antydnet at rotteblod og rottelever har tilnærmet lik *in vitro*  $T_{1/2}$  for heroin (upublisererte resultater).

Ulemper ved bruk av rotter som forsøksdyr i studier av heroinmetabolisme er blant annet at artsforskjellene i forekomst av esteraser i ulike vev og organer kan resultere i ulike vevseksponering for heroin og heroin-metabolitter, som igjen kan forårsake forskjellige farmakologiske effekter og toksisitet av heroin etter administrering. Rotter brukt i forskning er også ofte innavlet, og fanger dermed ikke den genetiske variasjonen som eksisterer i den humane populasjonen. Studiene gjort i denne masteroppgaven unngår komplekse problemstillinger relatert til artsvariasjoner og ekstrapolering da forsøksmaterialet er humant, men *in vitro* studier med humant materiale gir likevel ikke resultater som er direkte overførbare til *in vivo* human heroinmetabolisme.

## 4.4 Interindividuell variasjon i heroinmetabolisme

Kinetiske parametere er viktige verktøy for sammenlikning av heroinmetabolisme mellom ulike pasienter (se Tabell 3.4). Interindividuell variasjon i metabolisme kan ha mange årsaker, blant annet genetikk, alder, kjønn, sykdom eller livsstil (Liederer & Borchardt 2006). Individuell variasjon i esteraseaktivitet kan forårsake ulike farmakologiske effekter og toksisitet av heroin hos mennesker.

Rook et al. (2006b) observerte betydelige individuelle variasjoner i kinetiske parametere *in vivo* hos inhalerende og injiserende heroinister, men konkluderte med at variasjonene ikke skyldtes kausalitet mellom genetiske variasjoner i esteraseaktivitet og interindividuelle variasjoner i farmakokinetikk. I denne masteroppgaven ble det benyttet levervev fra seks ulike personer i studier av heroinmetabolisme. Resultatene antydte forskjell i  $T_{1/2}$  mellom pasientene, hvor tre pasienter så ut til å ha raskere nedbrytning av heroin i leverhomogenat sammenliknet med de to andre (se Tabell 3.4). Antallet pasienter inkludert i studien er for lavt til å kunne fastslå om de observerte variasjonene i heroinmetabolisme mellom pasientene skyldtes individuelle faktorer. For å kunne trekke konklusjoner om individuell variasjon i enzymaktivitet påvirker metabolisme av heroin, og eventuelt på hvilken måte, må det inkluderes flere pasienter i videre studier.

Årsaker til interindividuelle forskjeller i biotransformasjon er generelt vanskelige å identifisere. Levervevet brukt i denne oppgaven kan ha vært påvirket av sykdom og/eller medikamenter inntatt av pasientene, noe som må tas i betraktning ved tolkningen av resultatene. Medikamenter som metaboliseres av esteraser kan ha hatt innvirkninger på studiene i denne oppgaven, da det kan oppstå metning og/eller konkurranse om enzymene. Medikament-interaksjoner kan også forårsake enzyminduksjon og –inhibering. Dette er aktuelt for følgende medikamenter: Ultiva og Remifentanil som brytes ned av uspesifikke esteraser i blod og vev, Nimbex som har en metabolitt som brytes ned av plasmaesteraser, Glykopyrroniumbromid-neostigminmetylsulfat som kan fungere som en esterase-inhibitor, og Albumin Baxter da albumin er en kjent esterase (Li et al. 2005). Det vil si at alle pasientene (se Tabell 2.2) i større eller mindre grad var påvirket av medikamenter som potensielt kunne påvirke hepatisk heroinmetabolisme.

## 5 Konklusjon

Tidligere studier av heroinmetabolisme har hovedsakelig blitt utført med forsøksdyr som rotter og mus. I denne masteroppgaven ble heroinmetabolisme studert i humane leverpreparater, og dermed unngås problemstillinger relatert til artsforskjeller i esteraseaktivitet. Resultatene fra våre studier indikerte at enzymer i leverpreparatene katalyserte omdannelse av heroin svært effektivt da halveringstiden til heroin ble funnet å være 5 og 10 sekunder i hhv. humant leverhomogenat og humane levermikrosomer. Esterasene AChE og CE ble identifisert som de viktigste enzymene involvert i deacetyleringen av heroin i humane leverpreparater. Sammenlikning av  $T_{1/2}$  til heroin med tidligere *in vitro* studier av humant blod og homogenat av rottelever antydte at human lever har betydelig større kapasitet til å metabolisere heroin. Til tross for forskjeller i esteraseaktivitet i ulike vev hos forsøksdyr og menneske har studier vist at *in vivo*  $T_{1/2}$  til heroin er tilnærmet lik hos gnagere og menneske. Rotter kan derfor være en god dyremodell for studier av *in vivo* heroinmetabolisme, som av etiske årsaker er utfordrende å gjennomføre med mennesker. For studier av *in vitro* human hepatisk heroinmetabolisme fremstår humane levermikrosomer som en god *in vitro*-modell, da metabolisme av heroin samsvarte i stor grad mellom humane levermikrosomer og humant leverhomogenat. Dette kan også indikere at viktige heroinmetaboliserende enzymer er lokalisert i endoplasmatisk retikulum. Detaljert kunnskap om human heroinmetabolisme kan være av stor betydning for utvikling av ny farmakoterapi for heroinavhengighet og –overdose.



# Litteraturliste

- Alexander, J., Wilson, I. B., & Kitz, R. (1963). The reactivation of acetylcholinesterase after inhibition by methanesulfonic acid esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 238(2), 741–744.
- Alston, T. a. (2008). Kitz-Wilson Mechanisms of Action of Neostigmine and Penicillin. *The Open Anesthesiology Journal*, 2, 46–49.
- Andersen, J., Ripel, Å., Boix, F., Normann, P., & Mørland, J. (2009). Increased locomotor activity induced by heroin in mice: pharmacokinetic demonstration of heroin acting as a prodrug for the mediator 6-monoacetylmorphine in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 331(1), 153–161.
- Andersen, R. A., Aaraas, I., Gaare, G., & Fonnum, F. (1977). Inhibition of acetylcholinesterase from different species by organophosphorus compounds, carbamates and methylsulphonylfluoride. *General Pharmacology*, 8, 331–334.
- Anthony, J. C., Warner, L. a., & Kessler, R. C. (1994). Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants: Basic findings from the National Comorbidity Survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2(3), 244–268.
- Atack, J. R., Yu, Q. S., Soncrant, T. T., Brossi, a, & Rapoport, S. I. (1989). Comparative inhibitory effects of various physostigmine analogs against acetyl- and butyrylcholinesterases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 249(1), 194–202.
- Bahar, F. G., Ohura, K., Ogihara, T., & Imai, T. (2012). Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101, 3979–3988.
- Barrett, D. A., Dyssegaard, A. L. P., & Shaw, P. N. (1992). The effect of temperature and pH on the deacetylation of diamorphine in aqueous solution and in human plasma. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 44, 606–608.
- Berry, L., Wollenberg, L., & Zhao, Z. (2009). Esterase activities in the blood, liver and intestine of several preclinical species and humans. *Drug Metabolism Letters*, 3, 70–77.
- Bogen, I. L., Boix, F., Nerem, E., Mørland, J., & Andersen, J. M. (2014). A monoclonal antibody specific for 6-monoacetylmorphine reduces acute heroin effects in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 349, 568–576.
- Boix, F., Andersen, J. M., & Mørland, J. (2013). Pharmacokinetic modeling of subcutaneous heroin and its metabolites in blood and brain of mice. *Addiction Biology*, 18, 1–7.

- Brandon, E. F. a, Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2003). An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 189, 233–246.
- Brimijoin, S. (2011). Interception of cocaine by enzyme or antibody delivered with viral gene transfer: A novel strategy for preventing relapse in recovering drug users. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 10(68), 880–891.
- Brogan, W. C., Kemp, P. M., Bost, R. O., Glamann, D. B., Lange, R. a, & Hillis, L. D. (1992). Collection and handling of clinical blood samples to assure the accurate measurement of cocaine concentration. *Journal of Analytical Toxicology*, 16, 152–154.
- Brownstein, M. J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 5391–5393.
- Cappiello, M., Giuliani, L., & Pacifici, G. M. (1991). Distribution of UDP-glucuronosyltransferase and its endogenous substrate uridine 5'-diphosphoglucuronic acid in human tissues. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 41, 345–350.
- Chambers, J. P., Hartgraves, S. L., Murphy, M. R., Wayner, M. J., Kumar, N., & Valdes, J. J. (1991). Effects of three Reputed Carboxylesterase inhibitors Upon Rat serum esterase Activity. *Neuroscience & Biobehavioral Rewievs*, 15, 85–88.
- Chanda, S. M., Mortensen, S. R., Moser, V. C., & Padilla, S. (1997). Tissue-specific effects of chlorpyrifos on carboxylesterase and cholinesterase activity in adult rats: an in vitro and in vivo comparison. *Fundamental and Applied Toxicology*, 38, 148–157.
- Cohn, G. L., Cramer, J. A., & Kleber, H. D. (1973). Heroin metabolism in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 144(1), 351–355.
- Cornford, E. M., Braun, L. D., Oldendorf, W. H., & Hill, M. A. (1982). Comparison of lipid-mediated blood-brain-barrier penetrability in neonates and adults. *American Journal of Physiology*, 243, C161–C168.
- EMCDDA (2014). Annual report on the state of the drugs problem in Europe. *The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 1–73.
- Giacobini, E., Spiegel, R., Enz, A., Veroff, a. E., & Cutler, N. R. (2002). Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: Correlation with cognitive benefit. *Journal of Neural Transmission*, 109, 1053–1065.
- Glare, P. A., & Walsh, T. D. (1991). Clinical pharmacokinetics of morphine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 13, 1–23.
- Goldstein, A., & Naidu, A. (1989). Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Molecular Pharmacology*, 36, 265–272.

- Gorelick, D. a. (2012). Pharmacokinetic strategies for treatment of drug overdose and addiction. *Future Medicinal Chemistry*, 4(2), 227–243.
- Gottås, A., Øiestad, E. L., Boix, F., Vindenes, V., Ripel, Å., Thaulow, C. H., & Mørland, J. (2013). Levels of heroin and its metabolites in blood and brain extracellular fluid after i.v. heroin administration to freely moving rats. *British Journal of Pharmacology*, 170, 546–556.
- Grubič, Z., Sket, D., & M. Brzin. (1988). Iso-OMPA-induced potentiation of soman toxicity in rat correlates with the inhibition of plasma carboxylesterases. *Archives of Toxicology*, 62, 398–99.
- Hauan, K. M. (2014). *Identification and Modulation of Esterases Involved in the Metabolism of Heroin*. Master thesis, University of Oslo.
- Higby, G. J. (1986). Heroin and medical reasoning: The power of analogy. *New York State Journal of Medicine*, 86(3), 137–142.
- Hyatt, J. L., Moak, T., Hatfield, M. J., Tsurkan, L., Edwards, C. C., Wierdl, M., ... Potter, P. M. (2007). Selective inhibition of carboxylesterases by isatins, indole-2,3-diones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 1876–1885.
- Hyman, S. E. (2005). Addiction: A disease of learning and memory. *American Journal of Psychiatry*, 162, 1414–1422.
- Inturrisi, C., Schultz, M., Shin, S., Umans, J., Angel, L., & Simon, E. (1983). Evidence from opiate binding studies that heroin acts through its metabolites. *Life Sciences*, 33(Suppl 1), 773–776.
- Johnson, S. W., & North, R. a. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(2), 483–488.
- Kamendulis, L. M., Brzezinski, M. R., Pindel, E. V, Bosron, W. F., & Dean, R. a. (1996). Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279, 713–717.
- Karinen, R., Andersen, J. M., Ripel, A., Hasvold, I., Hopen, A. B., Mørland, J., & Christophersen, A. S. (2009). Determination of heroin and its main metabolites in small sample volumes of whole blood and brain tissue by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 33, 345–350.
- Klaassen, C. D., Amdur, M., & Doull, J. (2008). *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. (C. D. Klaassen, Ed.) (7th ed.). New York: The McGraw-Hill Professionals, 175–180.

- Klemenc, S. (2002). 4-Dimethylaminopyridine as a catalyst in heroin synthesis. *Forensic Science International*, 129, 194–199.
- Koelle, G. B., Davis, R., Diliberto, E. J., & Koelle, W. A. (1974). Selective, near-total, irreversible inactivation of peripheral pseudocholinesterase and acetylcholinesterase in cats in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 23, 175–188.
- Kuwayama, K., Tsujikawa, K., Miyaguchi, H., Kanamori, T., Iwata, Y. T., & Inoue, H. (2009). Determination of 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine as a metabolite of methamphetamine in rats and human liver microsomes using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 33, 266–271.
- Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E. G., Masson, P., & Lockridge, O. (2005). Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochemical Pharmacology*, 70, 1673–1684.
- Li, B., Stribley, J. a, Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L. M., Hammond, P., Lockridge, O. (2000). Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1320–1331.
- Liederer, B. M., & Borchardt, R. T. (2006). Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(6), 1177–1195.
- Lockridge, O., Mottershaw-Jackson, N., Eckerson, H. W., & La Du, B. N. (1980). Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 215(1), 1–8.
- Maxwell, D. M., & Brecht, K. M. (2001). Carboxylesterase: specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds. *Journal of Applied Toxicology*, 21, S103–S107.
- Milne, R. W., Nation, R. L., & Somogyi, a a. (1996). The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. *Drug Metabolism Reviews*, 28(3), 345–472.
- Nelson, a N. N. C., Huang, W. E. I., Moody, D. E., & Al, N. E. T. (2001). Variables in Human Liver Microsome Preparation : Impact on the Kinetics of L - alpha - Acetylmethadol ( Laam ) N -Demethylation and Dextromethorphan O -Demethylation. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(3), 319–325.
- Oldendorf, W. H., & Stoller, B. E. (1989). Simple method for determination of heroin deacetylation in rat and human serum. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology*, 41, 246–255.

- Oldendorf, W., Hyman, S., Braun, L., & Oldendorf, S. (1972). Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science*, 178(4064), 984–986.
- Pert, C. B. (1976). *Cell membrane receptors for viruses, antigens and antibodies, polypeptide hormones and small molecules*. (J. R. F. Beers & E. G. Bassett, Eds.). New York: Raven Press, 435–450.
- Pindel, E. V, Kedishvili, N. Y., Abraham, T. L., Brzezinski, M. R., Zhange, J., Dean, R. a, & Bosron, W. F. (1997). Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyses the hydrolysis of cocaine and heroin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14769–14775.
- Projean, D., Morin, P.-E., Tu, T. M., & Ducharme, J. (2003). Identification of CYP3A4 and CYP2C8 as the major cytochrome P450 s responsible for morphine N-demethylation in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 33(8), 841–854.
- Prosser, J., Cohen, L. J., Steinfeld, M., Eisenberg, D., London, E. D., & Galynker, I. I. (2006). Neuropsychological functioning in opiate-dependent subjects receiving and following methadone maintenance treatment. *Drug and Alcohol Dependence*, 84(3), 240–247.
- Prosser, J., London, E. D., & Galynker, I. I. (2009). Sustained attention in patients receiving and abstinent following methadone maintenance treatment for opiate dependence: Performance and neuroimaging results. *Drug and Alcohol Dependence*, 104(3), 228–240.
- Qiao, Y., Han, K., & Zhan, C.-G. (2014). Reaction pathways and free energy profiles for cholinesterase-catalyzed hydrolysis of 6-monoacetylmorphine. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12(14), 2214–27.
- Radic, Z., Pickering, N. a., Vellom, D. C., Camp, S., & Taylor, P. (1993). Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, 32, 12074–12084.
- Rook, E., Huitema, A., Brink, W., Ree, J., & Beijnen, J. (2006a). Pharmacokinetics and Pharmacokinetic Variability of Heroin and its Metabolites: Review of the Literature. *Current Clinical Pharmacology*, 1(1), 109–118.
- Rook, E. J., Van Ree, J. M., Van Den Brink, W., Hillebrand, M. J. X., Huitema, a. D. R., Hendriks, V. M., & Beijnen, J. H. (2006b). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high doses of pharmaceutically prepared heroin, by intravenous or by inhalation route in opioid-dependent patients. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 98, 86–96.
- Salmon, A. Y., Goren, Z., Avissar, Y., & Soreq, H. (1999). Human erythrocyte but not brain acetylcholinesterase hydrolyses heroin to morphine. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(January), 596–600.
- Schwardt, O., Kolb, H., & Ernst, B. (2005). Drug discovery today. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(5), 313–325.

- Scott, I. (1998). Heroin: A Hundred-Year Habit. Available at: <http://www.historytoday.com/ian-scott/heroin-hundred-year-habit>. Accessed: April 19, 2015.
- Selley, D. E., Cao, C. C., Sexton, T., Schwegel, J. a., Martin, T. J., & Childers, S. R. (2001).  $\mu$  Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: Evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. *Biochemical Pharmacology*, 62, 447–455.
- Sneader, W. (1998). The discovery of heroin. *Lancet*, 352, 1697–1699.
- Staack, R. F., Theobald, D. S., Paul, L. D., Springer, D., Kraemer, T., & Maurer, H. H. (2004). Identification of human cytochrome P450 2D6 as major enzyme involved in the O-demethylation of the designer drug P-methoxymethamphetamine. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(4), 379–381.
- Taketani, M., Shii, M., Ohura, K., Ninomiya, S., & Imai, T. (2007). Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life Sciences*, 81(11), 924–932.
- Thomsen, T., Zendeh, B., Fischer, J. P., & Kewitz, H. (1991). In vitro effects of various cholinesterase inhibitors on acetyl- and butyrylcholinesterase of healthy volunteers. *Biochemical Pharmacology*, 41(1), 139–141.
- Todrick, A. (1954). The inhibition of cholinesterases by antagonists of acetylcholine and histamine. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 9, 76–83.
- Umans, J. G., Chiu, T. S., Lipman, R. a, Schultz, M. F., Shin, S. U., & Inturrisi, C. E. (1982). Determination of heroin and its metabolites by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 233, 213–225.
- Verdejo, A., Toribio, I., Orozco, C., Puente, K. L., & Pérez-García, M. (2005). Neuropsychological functioning in methadone maintenance patients versus abstinent heroin abusers. *Drug and Alcohol Dependence*, 78(3), 283–288.
- Von Jagow, R., Kampffmeyer, H., & Kinese, M. (1965). The preparation of microsomes. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Fur Experimentelle Pathologie Und Pharmacologie*, 251(1), 73–87.
- Way, E. L., Kemp, J. W., Young, J. M., & Grassetti, D. R. (1960). The pharmacologic effects of heroin in relationship to its rate of biotransformation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 129, 144–154.
- Way, L. E., Young, J. M., & Kemp, J. W. (1965). Metabolism of heroin and its pharmacological implications. *Bulletin on Narcotics*, 005(1), 25–33.
- Williams, F. M. (1985). Clinical significance of esterases in man. *Clinical Pharmacokinetics*, 10, 392–403.

- Williams, J. T., Ingram, S. L., Henderson, G., Chavkin, C., Zastrow, M. Von, Schulz, S., Koch, T., Evans C.J., Christie, M. J. (2013). Regulation of  $\mu$ -Opioid Receptors: Desensitization, Phosphorylation, Internalization, and Tolerance. *Pharmacological Reviews*, 65, 223–254.
- Yan, Z., & Caldwell, G. W. (2003). Metabolic Assessment in Liver Microsomes by Co-activating Cytochrome P450s and UDP-glycosyltransferases. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(3), 223–232.
- Yang, H. S., Goudsouzian, N., & Martyn, J. A. (1996). Pseudocholinesterase-mediated hydrolysis is superior to neostigmine for reversal of mivacurium-induced paralysis in vitro. *Anesthesiology*, 84, 936–944.
- Zlebnik, N. E., Brimijoin, S., Gao, Y., Saykao, A. T., Parks, R. J., & Carroll, M. E. (2014). Long-term reduction of cocaine self-administration in rats treated with adenoviral vector-delivered cocaine hydrolase: evidence for enzymatic activity. *Neuropsychopharmacology*, 39, 1538–46.

# 6 Vedlegg

## 6.1 LC-MS/MS-betingelser

### Væskeskromatografi-betingelser:

Pumpe: Waters alliance 2695 HPLC Pumpe

Injeksjonsvolum: 10 µL

Mobilfase: Metanol (A), 5 mM ammoniumformatbuffer, pH 3,1 (B) (se Tabell 6.1)

Kolonne: XTerra® MS C18 3,5 µm (2,1 mm x 150 mm)

Strømningshastighet: 0,2 mL/min

Kolonnetemperatur: 50 °C

Kjøretid: 16 min

Software: Mass Lynx

**Tabell 6.1:** HPLC pumpegradient tidstabell

Tid (min)	A %	B %	Strøm (mL/min)
0,00	3,0	97,0	0,200
8,00	60,0	40,0	0,200
10,00	60,0	40,0	0,200
10,00	3,0	97,0	0,300
16,00	3,0	97,0	0,300

### MS/MS-betingelser:

MS-deteksjon: Quattro Premier XE tandem kvadrupol MS

Ionisering: Elektrospray i positiv modus (ESI+)

Kvantifisering: MRM (multiple reaction monitoring)



Ionekildetemperatur: 120 °C

Kapillærspenning: 2 kV

Conegass: N<sub>2</sub>, 400 °C, 50 L/h strømningshastighet

Tørkegass: N<sub>2</sub>, 900 L/h strømningshastighet

Kollisjons-gass: Argon

Kollisjonscelletrykk: 3,5\*10<sup>-3</sup> mbar

**Tabell 6.2:** LC-MS/MS-metode

<b>Substans</b>	<b>Rt (min)</b>	<b>MRM 1 (m/z)</b>	<b>MRM 2 (m/z)</b>	<b>Cone-spenning (V)</b>	<b>Kollisjons-energi (eV)</b>
M3G	2,7	462,0 >286,0	462,0 >268,0	45	30/30
M6G	4,1	462,0 > 286,0	462,0 >268,0	45	30/30
Morfin	3,5	286,0 >201,0		45	20
6-MAM	8,1	328,0 >211,0		45	25
Heroin	9,9	370,0 >268,0		50	30
Normorfin	3,1	272,0 >165,0	272,0 >201,0	45	35/25
<b>Internstandard</b>					
M3G-d3	2,7	465,0 > 289,0		50	30
M6G-d3	4,1	465,0 > 289,0		50	50
Morfin-d6	4,6	292,0 > 201,0		45	25
6-MAM-d6	8,2	334,0 > 211,0		45	25
Heroin-d9	9,9	379,0 > 272,0		45	28

Internstandard tilsettes for at det skal være mulig å korrigere for endringer i de kromatografiske betingelsene, massetap og fortynningseffekter under prøveopparbeidelse og variasjoner i det injiserte volum.

## 6.2 Data fra studier med humant blod

Tidligere studier i vår forskningsgruppe har undersøkt halveringstider av heroin i humant fullblod (upubliserte resultater). Resultatene presenteres i Tabell 6.4. Dataene ble inkludert for å kunne gjøre statistisk sammenlikning mellom  $T_{1/2}$  for heroin i humant leverhomogenat og  $T_{1/2}$  for heroin i humant blod.

Blodet ble donert fra friske voksne mennesker av begge kjønn. Metoden er tilsvarende som for «Heroinmetabolisme i humant leverhomogenat» (se kap 2.4.1), med unntak av at sluttkonsentrasjon for heroin var  $0,4 \mu\text{M}$  ( $n = 5$ ).

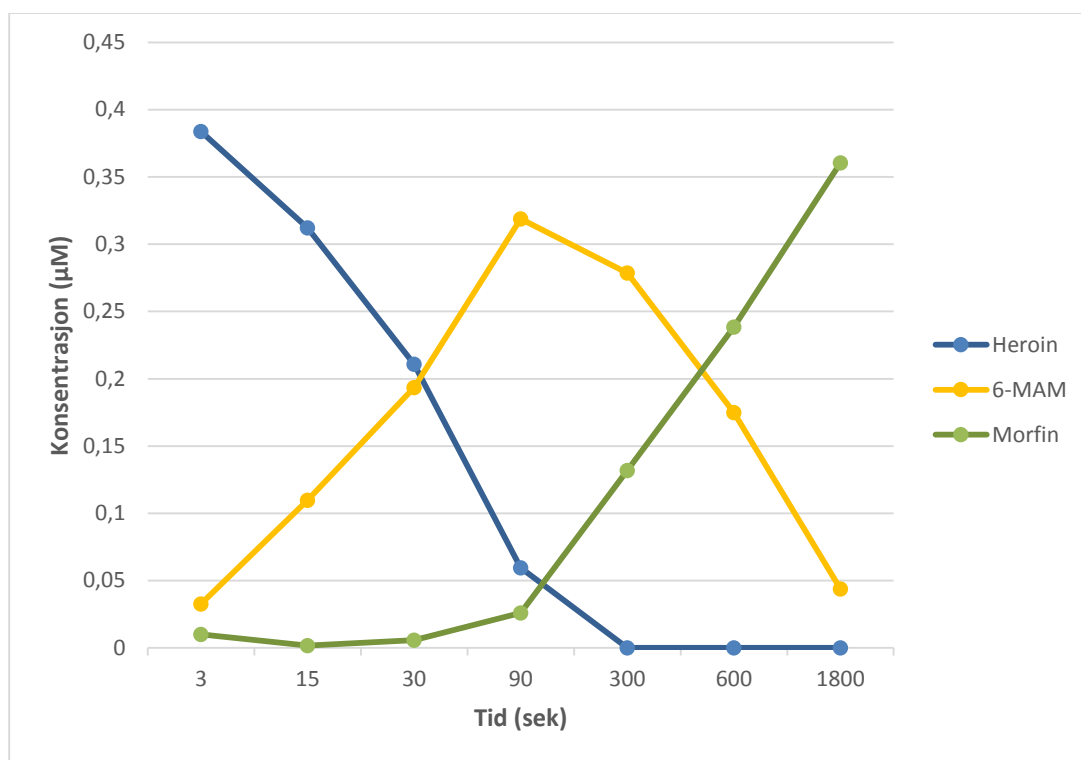
**Tabell 6.4:** Kinetikkdata fra studier med humant blod,  $n = 5$ .

	<b>Dose (<math>\mu\text{mol}</math>)</b>	<b><math>T_{1/2}</math> Heroin (min)</b>
	4,80E-05	17,60
	4,80E-05	30,46
	4,80E-05	25,69
	4,80E-05	15,45
	4,80E-05	24,99
Gj.snitt		22,8
St.avvik		6,2
SEM		2,8
n		5

## 6.3 Data fra studier med perfundert rottelever

Hauan (2014) utførte studier av heroinmetabolisme i perfundert rottelever, resultatet er presentert i Figur 6.1. Dataene ble inkludert for å kunne gjøre statistisk sammenlikning mellom  $T_{1/2}$  til heroin i humant leverhomogenat og i perfundert rottelever

Metoden var den samme som i «Heroinmetabolisme i humant leverhomogenat» (se kap. 2.4.1), med unntak av at levervevet var perfundert og fortynnet 1:2 med PBS-buffer. Suttkonsentrasjonen til heroin var  $0,4 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ .



**Figur 6.1:** Konsentrasjonskurver for omdannelse av heroin til 6-MAM og morfin fra studier med perfundert rottelever.

Dataene fra Hauans (2014) studie ble brukt for kalkulere halveringstid for heroin og 6-MAM i perfundert rottelever (Tabell 6.5).

**Tabell 6.5:** Kinetikkdata fra studier med perfundert rottelever, basert på data fra Figur 6.1.

	<b>T<sub>1/2</sub> Heroin (sek)</b>	<b>T<sub>1/2</sub> 6-MAM (sek)</b>
	41,56	459,40
	25,23	434,55
	33,78	537,07
	29,81	557,12
Gj. snitt	32,60	497,04
SD	6,92	59,25
SEM	3,46	29,63
n	4	4

